



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Optimización del ensayo de unión tipo FRET entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias

PRESENTA

Biol. María del Carmen Santana Calvo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Liliana Pardo López
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Gloria Saab Rincón
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Agosto, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del alumno

Biol.
María del Carmen
Santana
Calvo
Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología
304816576

Datos del tutor principal

Dr.
Takuya
Nishigaki
Shimizu

Datos del comité tutor

Dra.	Dra.
Liliana	Gloria
Pardo	Saab
López	Rincón

Datos del sinodal 1 (Presidente)

Dr.
Ernesto
Ortiz
Suri

Datos del sinodal 4 (Vocal)

Dr.
Rubén Paul
Gaytán
Colín

Datos del sinodal 2 (Secretario)

Dr.
Roberto Carlos
Muñoz
Garay

Datos del sinodal 5 (Vocal)

Dr.
Gabriel
Corkidi
Blanco

Datos del sinodal 3 (Vocal)

Dra.
Carmen Nina
Pastor
Colón

Datos del trabajo escrito

Optimización del ensayo de unión tipo FRET entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc.
153 p.
2016

Este trabajo se realizó en el laboratorio del “Consortio de Fisiología del Espermatozoide” (laboratorio número 16 del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular) en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la asesoría del Dr. Takuya Nishigaki Shimizu.

Para la realización de este proyecto se recibieron los siguientes apoyos:

- Beca CONACYT para programa de posgrado (CVU 488987).
- Donativo CONACYT Ciencia Básica (177138 de TN, 128566 del consorcio de fisiología del espermatozoide).
- Donativo DGAPA-PAPIIT (IN203513, IN206116).

También se contó con el apoyo del Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP) para presentar los resultados de este proyecto en el congreso internacional: “13th Conference on Methods and Applications of Fluorescence”, que se llevó a cabo del 8 al 11 de septiembre de 2013 en Génova, Italia.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo técnico, experimental y administrativo de:

Apoyo durante la realización de experimentos:

- El Dr. Christopher Wood del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.
- La Dra. Gloria Saab Rincón del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

Apoyo técnico:

- El M. en C. Jorge Arturo Yáñez, el M. en C. Eugenio López Bustos y el Dr. Paul Gaytán, de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Morelos.
- El Dr. Christopher Wood del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.
- La B. A. Dip. Lib. A. L. A. Shirley Ainsworth y el L. I. Omar Arriaga de la Unidad de Biblioteca del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.
- El M. en T. I. Juan Manuel Hurtado y el Ing. Roberto Rodríguez Bahena de la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.
- Los técnicos académicos M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, M. en C. Paulina Torres Rodríguez y el M. en C. José Luis de la Vega Beltrán, el técnico laboratorista Lic. Jorge Antonio Blancas y el auxiliar de laboratorio Miguel A. Trujillo, miembros del laboratorio del consorcio de fisiología del espermatozoide del Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Morelos.

Apoyo administrativo:

- El Ing. Jalil Saab, el Lic. J. Antonio Bolaños Guillén y Gloria Villa de la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Morelos.
- El secretario Leonel Linares Labastida.

AGRADECIMIENTOS

Directa o indirectamente, la culminación de este proyecto es el producto del apoyo que he recibido a lo largo de estos años por un gran número de personas, por lo que sería imposible incluirlos a todos. Intentaré mencionar al menos a las personas que directamente aportaron algo a este trabajo (no se sientan ofendidos si olvidé a alguien pues mi memoria no es infalible).

A mi familia:

En especial a mi papá y mamá, ya que son parte de las personas a quienes más quiero y las que siempre han estado a mi lado apoyándome. A mi hermano Héctor y su novia Jimena, por sus charlas a la hora de la cena. A mis abuelitos, por ser el pilar de toda mi familia y quienes han cuidado de mí desde que tengo memoria. A mis tíos Roberto y Susi, y Toño y Jenni, por todo su cariño y confianza, por no rendirse, incluso en los momentos de más profunda desesperación.

A mi tutor:

El Dr. Takuya Nishigaki, quien ha sido mi guía y amigo en este largo camino. Gracias por tus comentarios y por inculcar en mí una visión crítica y objetiva de la ciencia.

A mi comité tutor:

La Dra. Liliana Pardo y la Dra. Gloria Saab, por sus comentarios, críticas y correcciones durante los tutorales. Quiero agradecer especialmente la ayuda que la Dra. Gloria Saab me brindó en la realización de la toma de espectros de dicroísmo circular, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Chris Wood:

Por su ayuda y orientación en la planeación, realización y discusión de los experimentos de tiempo de vida media, efectuados en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA, UNAM) y por todo el interés que muestra hacia la ciencia.

A los miembros del jurado:

La Dra. Nina Pastor y los Dres. Ernesto Ortiz, Paul Gaytán, Gabriel Corkidi y Carlos Muñoz Garay. Gracias por sus correcciones, comentarios críticos y excelentes aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio Darszon-Nishigaki-Treviño:

Gracias por sus palabras de aliento, compañerismo y por esos momentos de risas y diversión en el laboratorio que suceden, quién sabe por qué (:V), después de las 7:30 pm. De cada uno de ustedes he aprendido algo (desde desteñir geles rápidamente en el microondas y su receta del “magic mix”, hasta como prender el carbón para un asado y sus mejores consejos, recomendaciones e incluso advertencias sobre la academia y la vida en general). Además, le agradezco especialmente a la Dra. Carmen Beltrán y a la M. en C. Yoloxóchitl Sánchez, por haberme ayudado a resolver las dudas referentes a purificación y análisis de proteínas y técnicas de biología molecular. A la Dra. Ana Laura González Cota, por sus correcciones y comentarios críticos sobre este trabajo, por darme ánimos cuando me daba por vencida. Al Dr. Ignacio López, por sus comentarios de aliento. Al Dr. Alberto Darszon y a la Dra. Claudia Treviño, porque estuvieron al pendiente de mi desarrollo como estudiante.

A mis amigos del IBt:

En especial a Marel Chenge y a Rodrigo Arreola por no perder el contacto, por sus continuas visitas, por estar al tanto de mi avance y darme ánimo. A los integrantes del Instituto Down Ori, Sandra, Cris, Gigi, Checho, Fabio V. y Francisco, por su amistad, por todas las risas y locuras que vivimos en nuestra época de “party animals”. A Jesús, por sus consejos, deliciosas comidas y por haber sido un buen vecino. A los chicos de los asados Ruth, Ana, Rocío, Enrique, Gerardo, César, Carlos por todos los jueves de divertidas charlas, comida rica y buen vino.

A Ana:

Por todos los momentos que compartimos, por todo tu cariño y apoyo. Gracias por todos las tardes de películas y por tus invenciones culinarias.

Por último, aunque parezca ridículo y la probabilidad de que lo lean sea insignificante, quiero agradecer a Shimomura, Prasher, Chalfie y Tsien, ya que sin ellos muchos de nosotros seguiríamos trabajando en la oscuridad. (Although it seems ridiculous and the likelihood that they read this is almost zero, I want to thank Shimomura, Prasher, Chalfie and Tsien, without whom many of us would still be working in the dark).

*En memoria de mi amiga Pila.
Aunque dejaste este mundo antes
de lo esperado, tu amistad y cariño
persisten en nuestros recuerdos.*

*Para mi papá,
porque te aferraste a la vida.*

*Para mi mamá,
por tu temple y fortaleza.*

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIACIONES	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1. 1. Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD)	13
1. 2. CNBDs no canónicos.....	19
1. 3. Dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD)	22
2. ANTECEDENTES	25
2. 1. FRET	25
2. 2. Ensayo de unión tipo FRET	30
2. 3. Proteína fluorescente mAmetrine	33
2. 4. Dy-547: un aceptor para mAmetrine	37
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	43
5. 1. Objetivo General	43
5. 2. Objetivos Particulares	43
6. MÉTODOS	45
6. 1. Preparación de células quimiocompetentes	45
6. 2. Transformación de células quimiocompetentes.....	46
6. 3. Purificación de plásmido por lisis alcalina (miniprep)	46
6. 4. PCR.....	47
6. 5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	47
6. 6. Aislamiento de DNA a partir de un gel de agarosa.....	48
6. 7. Digestión con enzimas de restricción	48
6. 8. Purificación de DNA en columna de sílica.....	48
6. 9. Ligación de fragmentos de DNA.....	49

6. 10. Mutagénesis sitio dirigida	49
6. 11. Selección de colonias positivas	50
6. 12. Expresión de proteína	50
6. 13. Purificación de proteína	51
6. 13. 1. Cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	51
6. 13. 2. Diálisis	52
6. 14. Cuantificación de proteína	52
6. 14. 1. Espectrofotometría de absorción en el rango de luz visible	52
6. 14. 2. Método de Lowry	53
6. 15. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	53
6. 16. Dicroísmo circular	54
6. 17. Adquisición de los espectros de fluorescencia.....	54
6. 18. Ensayo de unión en solución y por espectrofluorometría.....	55
6. 19. Cultivo celular.....	55
6. 20. Transfección de células CHO.....	56
6. 21. Ensayo de unión con microscopía FLIM.....	57
6. 21. 1. Con proteína purificada	57
6. 21. 2. En células de cultivo que expresan las proteínas en su superficie.....	58
6. 22. Ensayos de apagamiento (“quenching”) por Cu ²⁺	58
7. RESULTADOS	59
7. 1. Desarrollo del ensayo de unión entre EPAC-Ametrine y 8-[Dy-547]-AMPc.....	59
7. 1. 1. Preparación de los plásmidos que codifican para las quimeras EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2	59
7. 1. 2. Expresión de las proteínas quiméricas	63
7. 1. 3. Determinación de los espectros de fluorescencia.....	65
7. 1. 4. Ensayo de unión tipo FRET en solución	68
7. 1. 5. Ensayo de unión midiendo el tiempo de vida media del donador (τ_D)	74
7. 2. Expresión de EPAC-mAmetrine 1.2 en la superficie de células eucariotas.....	76
7. 2. 1. Construcción de los plásmidos EPAC-mAmetrine 1.2-pDisplay y EPAC _{R279E} -mAmetrine 1.2-pDisplay.....	77

7. 2. 2. Ensayos de apagamiento por Cu^{2+} de las proteínas fluorescentes en la superficie de la membrana de células CHO	78
8. DISCUSIÓN	81
8. 1. Ensayo de unión entre un CNBD y AMPc	81
8. 1. 1. Ensayo de unión mediante FRET intermolecular.....	83
8. 1. 1. 1. mAmetrine vs mAmetrine 1.2.....	84
8. 1. 1. 2. Comparación de los pares FRET: EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc vs EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc	85
8. 1. 1. 2. 1. Dy-547 como aceptor de mAmetrine1.2	86
8. 1. 1. 2. 2. Ventajas del nuevo par FRET	88
8. 1. 1. 3. Mutante EPAC _{R279E} -mAmetrine1.2	91
8. 2. Expresión de la proteína EPAC-mAmetrine1.2 en la superficie de la membrana plasmática	92
8. 3. Proteínas con CNBD no caracterizados en el espermatozoide.....	95
9. CONCLUSIONES	99
10. PERSPECTIVAS	101
11. REFERENCIAS	103
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	117
12. 1. Materiales.....	117
12. 1. 1. Medios y soluciones	117
12. 1. 2. Enzimas	119
12. 1. 3. Oligonucleótidos.....	122
12. 1. 4. Plásmidos	123
12. 2. Figuras suplementarias.....	133
APÉNDICE.....	143
Desarrollo de un método de clonación que permite la selección por color de colonias positivas para plásmidos del tipo CNBD-mAmetrine 1.2.....	143
♦ Preparación del plásmido mCherry-stop-mAmetrine 1.2-pRSETb	145
♦ Ejemplo de preparación de un plásmido tipo CNBD-mAmetrine 1.2 utilizando el método de selección por color.....	146

ABREVIACIONES

8-CPT-AMPc	8- (4- Clorofeniltio)adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
8-[Dy-547]-AMPc	8- (2- [Dy-547]- aminoetiltio) adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
8-[Fluo]-AMPc	8- (2- [Fluoresceinil]-aminoetiltio) adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
8-[NBD]-AMPc	8- (2- [7- Nitro- 4- benzofurazani]aminoetiltio)adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
Abs _{λ_{\max}}	Longitud de onda del pico de absorción
ACs	Adenilato ciclasa soluble
AMPc	3', 5' Adenosín monofosfato cíclico
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
CAP	Proteína activadora por catabolitos, también conocida como CRP
CD	Dicroísmo circular
CFP	Proteína cian fluorescente
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNBDH	Dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNG	Canales regulados por nucleótidos cíclicos
CooA	Activador transcripcional dependiente de monóxido de carbono
CprK	Regulador transcripcional de la deshalogenasa reductora de o-clorofenol
CRIS	Receptor de AMPc involucrado en el funcionamiento del espermatozoide
CRP	Proteína receptora de AMPc, también conocida como CAP
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
<i>E</i>	Eficiencia de FRET
EAG	Canales iónicos <i>ether-a-gò-gò</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELK	Canales de K ⁺ parecidos a los canales <i>ether-a-gò-gò</i>
Em _{λ_{\max}}	Longitud de onda del pico de emisión
EPAC	Proteína dependiente de AMPc que intercambia nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas
ERG	Canales iónicos relacionados al gene de los canales <i>ether-a-gò-gò</i>
Ex _{λ_{\max}}	Longitud de onda del pico de excitación
<i>F_D</i>	Intensidad de fluorescencia del donador
<i>F_{DA}</i>	Intensidad de fluorescencia del donador en presencia del aceptor
FRET	Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia de Förster
FNR	Regulador de la fumarato/nitrato reductasa
FPs	Proteínas fluorescentes
<i>g</i>	Fuerza G
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GMPc	3', 5' Guanosín monofosfato cíclico
HA	Hemaglutinina A

HCN	Canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
hERG	Canal relacionado con los canales <i>ether-à-go-go</i> de humano
I. F. N	Intensidad de fluorescencia normalizada
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación
J	Integral de la sobreposición del espectro de emisión del donador con el de excitación del aceptor
KAT	Lisinacetyltransferasa
KCNG	Canales de K^+ regulados por nucleótidos cíclicos (también conocido como tetraKCNG)
KCNH	Familia de canales de potasio dependientes de voltaje relacionados con hERG
K_d	Constante de disociación
k_D	Constante de decaimiento de la fluorescencia del donador
k_T	Velocidad de transferencia de energía
kDa	Kilodalton
LB	Caldo lisogénico
min	Minuto
MlotiK	Canal de K^+ de la bacteria <i>Mesorhizobium loti</i>
mECFP	CFP monomérica mejorada (Enhanced monomeric CFP)
n	Índice de refracción del medio
N_A	Número de Avogadro
NMPc	Nucleótido cíclico
p -HBI	4-(p -hidroxibencilideno)imidazolina-5-ona
pb	Pares de bases
PBC	Casete de unión a fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFR	Dominio transmembranal de la proteína derivada de plaquetas que funciona como receptor del factor de crecimiento
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
R_0	Distancia de Förster
R_{DA}	Distancia entre el donador y el aceptor
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
sNHE	Intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide
sp.	Especie
TAE	Tris-acetato-EDTA
T_m	Temperatura de fusión
U. A. F.	Unidades arbitrarias de fluorescencia
zELK	Canales de K^+ parecidos a EAG de pez cebra
ϵ	Coefficiente de extinción molar
κ^2	Factor de orientación de los fluoróforos
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
τ_D	Tiempo de vida media de la fluorescencia del donador
τ_{DA}	Tiempo de vida media del donador en presencia del aceptor
Φ	Eficiencia o rendimiento cuántico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características conservadas en los CNBDs.....	14
Figura 2. Comparación estructural de los CNBD de EPAC y HCN.	17
Figura 3. Comparación entre los PBC de PKA y el de los CNBDs no canónicos.	21
Figura 4. Comparación estructural entre el CNBD de HCN2 y el CNBHD de zELK...24	
Figura 5. FRET y diagrama de Jablonski simplificado.....	25
Figura 6. Ensayo de unión tipo FRET.	31
Figura 7. Desventajas del par FRET EPAC-CFP 8-[Fluo]-AMPc.	32
Figura 8. Estructura y espectros de fluorescencia de mAmetrine.....	34
Figura 9. Maduración del cromóforo SYG de la wtGFP.	35
Figura 10. Estructura y espectros de Dy-547 y tdTomato.....	38
Figura 11. Inserción de los sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III mediante PCR.	60
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido EPAC-CFP-pRSET y de los productos de PCR EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2 digeridos con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.	61
Figura 13. Selección de colonias positivas mediante fluorescencia.	62
Figura 14. Seguimiento de la expresión y purificación de las proteínas quiméricas mediante fluorescencia.....	63
Figura 15. Comparación de los métodos utilizados para medir la concentración de las proteínas quiméricas.....	64
Figura 16. Geles de electroforesis desnaturante SDS-PAGE de las proteínas quiméricas EPAC-CFP, EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2.	65
Figura 17. Espectros de fluorescencia de EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2.....	66
Figura 18. Espectros de fluorescencia y estructura de 8-[Dy-547]-AMPc.....	67
Figura 19. Sobreposición de los espectros de emisión del donador con el de excitación del aceptor.	67
Figura 20. Espectros de emisión de EPAC-mAmetrine1.2 y 8-[Dy-547]-AMPc excitados a 406 nm.	68
Figura 21. Ensayo de unión a distintas proporciones de donador y aceptor.....	69
Figura 22. Comparación de los espectros de emisión en presencia de competidor.....	70
Figura 23. Preparación de la mutante EPAC _{R279E} -mAmetrine1.2.....	71
Figura 24. La mutación R279E evita la unión entre el CNBD y el análogo de AMPc.	72
Figura 25. Evaluación de la estructura secundaria por dicroísmo circular.....	73
Figura 26. Ensayo de unión midiendo la τ del donador.....	74
Figura 27. Construcción de pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2 y su mutante.....	78
Figura 28. EPAC-mAmetrine1.2 no se expresa en la superficie celular.	80
Figura 29. Alineamiento de los CNBD de EPAC 1 y EPAC 2 que muestra el motivo [D\E]XXXL[L\I].....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las FPs con un corrimiento de Stokes grande.....	33
Tabla 2. Propiedades espectroscópicas de tdTomato y Dy-547.....	37
Tabla 3. Características reportadas de los fluoróforos utilizados en este trabajo.	53
Tabla 4. Eficiencia de FRET a distintas proporciones de donador : aceptor	68
Tabla 5. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular en el servidor CAPITO	73
Tabla 6. Valores de eficiencia de FRET aparente obtenidos por FLIM	75
Tabla 7. Valores de R_0 de cada par FRET.....	86
Tabla 8. Comparación entre Dy-547 y Cy3B.....	88

RESUMEN

El 3', 5' adenosín monofosfato cíclico (AMPc) fue el primer segundo mensajero en ser descubierto y desde entonces se le ha vinculado en la regulación de múltiples funciones celulares tanto en procariontes como en eucariontes. En los espermatozoides de mamíferos y erizo de mar, el AMPc tiene un papel preponderante en su fisiología ya que regula los procesos que capacitan a los espermatozoides para fecundar. Dentro de esta célula, el AMPc es producido casi en su totalidad por la adenilato ciclasa soluble (ACs) la cual interacciona íntimamente con el intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). Es tal la importancia de estas dos proteínas que la pérdida de función de cualquiera de ellas ocasiona infertilidad. Asimismo, el sNHE es una proteína transmembranal muy particular, ya que además de tener un dominio sensor de voltaje (VSD) posee un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD), lo que sugiere una regulación directa por este segundo mensajero. Sin embargo, aún no existen evidencias experimentales que impliquen una regulación directa por AMPc. Además, existe una lista extensa de proteínas que como el sNHE tienen un CNBD que posiblemente regule su función, pero del que no se tienen evidencias bioquímicas que lo corroboren.

En virtud de lo anterior, en el laboratorio desarrollamos un ensayo de unión tipo FRET entre un dominio CNBD y nucleótidos cíclicos (NMPc) utilizando como donador a la proteína cian fluorescente (CFP) unida a un CNBD y como aceptor al análogo fluorescente de AMPc 8-[Fluo]-AMPc. A pesar de que este ensayo demostró tener una gran sensibilidad y especificidad, ya que puede ser usado inclusive con proteína no purificada, tiene una gran desventaja: los espectros de excitación de estos dos fluoróforos se sobreponen en demasía, por lo que al realizar el ensayo el aceptor es excitado directamente por la fuente de luz; esto trae como consecuencia que parte de la señal no se deba a la transferencia de energía. Por ello

es necesario realizar un ensayo extra con un competidor (AMPc o un análogo no fluorescente) para poder determinar si el cambio en la fluorescencia se debe directamente a la transferencia de energía promovida por la unión entre el CNBD y el análogo fluorescente de AMPc.

Por lo anterior nos hemos enfocado en optimizar nuestro método mediante el uso de un donador con corrimiento de Stokes grande en un nuevo par FRET. Elegimos a la proteína fluorescente Ametrine ya que su eficiencia cuántica es de las más altas dentro de las proteínas fluorescentes con corrimiento de Stokes grande. Como aceptor utilizamos al análogo fluorescente de AMPc 8-[Dy-547]-AMPc ya que sus espectros de excitación y emisión son similares a los de tdTomato (una proteína fluorescente que funciona como un buen aceptor para Ametrine).

Con el nuevo par FRET EPAC-Ametrine\8-[Dy-547]-AMPc logramos evitar la excitación basal del aceptor, por lo que podemos realizar los ensayos de unión sin necesidad del ensayo de competencia. Esto es una característica deseable si queremos hacer un tamizaje masivo de CNBDs con función no determinada. Además proponemos el uso del par FRET mAmetrine–Dy-547 como una excelente opción para medir cualquier interacción intermolecular.



1. INTRODUCCIÓN

La célula es la unidad estructural y funcional de los seres vivos; posee una membrana lipídica que separa a sus componentes del exterior, conservando así su integridad como un sistema químico altamente organizado con capacidad de autorreplicación (Nelson & Cox, 2008; Alberts *et al.*, 2015). Sin embargo, para poder sobrevivir, las células, necesitan responder apropiadamente al medio que las rodea, ya que constantemente reciben información proveniente de células vecinas y del medio en el que se encuentran (Alberts *et al.*, 2015). La transducción de señales es el mecanismo por el cual se generan respuestas celulares orquestadas a los estímulos externos, mediante su procesamiento y transformación a señales bioquímicas (Hunter, 2000).

Un ejemplo de transducción de señales sucede en el proceso de quimiotaxis mediada por speract en los espermatozoides de erizo de mar de la especie *Strongylocentrotus purpuratus*. Cabe recordar que estos animales son de fecundación externa por lo que en su época reproductiva liberan los gametos hacia el medio externo; para que se preserve la especie, el gameto masculino tiene que ser capaz de detectar e interpretar correctamente las señales enviadas por el óvulo para poder llegar hasta él y fecundarlo. Una de estas señales es el speract, un decapeptido (GFDLNNGGGVG) que se encuentra en la capa externa de los óvulos de este erizo de mar, el cual difunde creando un gradiente (Hansbrough & Garbers, 1981). El receptor del speract en el espermatozoide se encuentra localizado exclusivamente en el flagelo; cuando ocurre la unión del ligando, provoca un cambio conformacional en el receptor que estimula la actividad de la guanilato ciclasa asociada, es decir se comienza a sintetizar 3', 5' guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Hansbrough & Garbers, 1981). El GMPc activa a su vez al tetraKCNG, un canal iónico selectivo a K⁺ (Galindo *et al.*, 2000; Strünker *et al.*, 2006). La apertura del tetraKCNG permite la salida de K⁺, lo que provoca una hiperpolarización en la

membrana plasmática (Lee & Garbers, 1986; Babcock *et al.*, 1992). Esta hiperpolarización podría activar a tres proteínas transmembranales: al intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE), al canal iónico activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos específico de los espermatozoides de *Strongylocentrotus purpuratus* 1 (spHCN1), también conocido como spIH (canal iónico que media la corriente activada por hiperpolarización, I_H) y al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (NCKX).

La activación del sNHE permitiría la salida de protones, acoplada a la entrada de Na^+ , lo que traería como consecuencia una alcalinización intracelular (Hansbrough & Garbers, 1981; Lee & Garbers, 1986). Esta alcalinización estimularía la actividad de la adenilato ciclasa soluble (ACs), por lo que la concentración de AMPc (3', 5' adenosín monofosfato cíclico) incrementaría (Hansbrough & Garbers, 1981; Nomura *et al.*, 2005; Nomura & Vacquier, 2006). La activación del NCKX provocaría un descenso transitorio en los niveles de Ca^{2+} (Su *et al.*, 2005). Simultáneamente, la activación del spHCN1 por la hiperpolarización provocaría la entrada de Na^+ , por lo que se despolarizaría la membrana, además la unión del AMPc al canal incrementaría la amplitud de la corriente, intensificando la despolarización (Gauss *et al.*, 1998). Todo esto traería como consecuencia un incremento en el Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) que es dependiente de Ca^{2+} externo, es decir, no involucra la participación de pozas internas. La entidad molecular responsable de este incremento aún no está del todo definida, pero un fuerte candidato es el canal iónico Catsper (canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide) ya que es altamente dependiente de pH_i (se activa por alcalinización) y moderadamente dependiente de voltaje (Ren *et al.*, 2001; Kirichok *et al.*, 2006). Se ha propuesto que el incremento del Ca^{2+}_i promueve (Böhmer *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2010) la apertura de un canal de Cl^- regulado por Ca^{2+} (CaCC) y un canal de K^+ regulado por Ca^{2+} (CaKC), los cuales contribuirían en regresar a la membrana a su

potencial de reposo (Wood *et al.*, 2007; Espinal-Enríquez *et al.*, 2011, 2014); asimismo, se propone que un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ está involucrado en regresar la concentración Ca^{2+} a su estado basal. Estos últimos dos eventos terminan la transducción de señales y permiten que se repita nuevamente la vía de señalización creando ciclos, por lo que el aumento de Ca^{2+} en el flagelo sería oscilatorio (Böhmer *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2010). De hecho, el comportamiento oscilatorio del Ca^{2+} en el flagelo es el responsable de redireccionar el nado del espermatozoide, ya que con cada incremento de Ca^{2+} el espermatozoide da una vuelta pronunciada y cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye el nado se vuelve progresivo (en línea recta), llevando al espermatozoide hacia el óvulo siguiendo el gradiente de speract (Böhmer *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2010).

En el caso de los espermatozoides de mamífero, esta vía de señalización no está presente, por lo que no existe un péptido tipo speract. Como la fecundación en estos organismos es interna, las señales que recibe el espermatozoide para poder fecundar el óvulo son producidas y dependen del tracto reproductor femenino, como la progesterona y el grado de viscosidad del medio (Harper *et al.*, 2004; Miki & Clapham, 2013).

Un estímulo muy peculiar en los espermatozoides de mamífero es el anión bicarbonato (HCO_3^-), ya que por su naturaleza iónica no puede atravesar libremente la membrana celular, por ende necesita la ayuda de canales iónicos y transportadores para ingresar a la célula y poder regular a sus proteínas blanco. Aunado a esto, la concentración intracelular de HCO_3^- también puede incrementar debido a la hidratación del CO_2 proveniente de las mitocondrias. Esta reacción es catalizada por las anhidrasas carbónicas.

El cambio en la concentración de HCO_3^- es una señal de suma importancia en el caso de los espermatozoides de mamífero, ya que durante su viaje hacia el óvulo la concentración extracelular de este ion cambia drásticamente a lo largo del

trayecto (Levine & Marsh, 1971; Maas *et al.*, 1977). De hecho, la entrada del HCO_3^- al espermatozoide funciona como una señal de inicio y de regulación de los distintos procesos celulares que deben de efectuarse para que pueda ocurrir la fecundación (Liu *et al.*, 2012).

Adicionalmente a su ampliamente conocida función como amortiguador de pH, en el espermatozoide, el HCO_3^- tiene un papel preponderante en las vías de señalización mediadas por AMPc (Hess *et al.*, 2005). Esto se debe a que el HCO_3^- funciona como un regulador positivo de la ACs, la proteína encargada de catalizar la síntesis de AMPc utilizando como sustrato ATP (adenosín trifosfato). La ACs es la principal fuente de producción de este segundo mensajero en los espermatozoides de mamífero e invertebrados marinos como el erizo de mar.

Es tal la importancia del AMPc en la fisiología del espermatozoide que los ratones nulos para la ACs tienen un fenotipo infértil y con defectos en la motilidad flagelar. Además, el fenotipo se logra rescatar con la adición de análogos permeables de AMPc en el medio (Esposito *et al.*, 2004). Asimismo, se ha comprobado que la ACs interacciona íntimamente con el sNHE, el cual es otra proteína de importancia en la fisiología del espermatozoide (Wang *et al.*, 2007).

De hecho, los ratones nulos para el sNHE también son infértiles y de la misma manera que para la ACs, el fenotipo se rescata con la adición de análogos permeables de AMPc, por lo que se piensa que la correcta expresión del sNHE y la ACs es indispensable para la otra. De manera interesante, el análisis de la secuencia del sNHE sugiere la presencia de un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) en su extremo carboxilo (Wang *et al.*, 2003). Es importante mencionar que este dominio CNBD también se encuentra en algunos de los canales iónicos antes mencionados, como el tetraKCNG y el spHCN1.

La presencia del CNBD en el sNHE y las evidencias de su interacción física con la ACs apuntan a que su actividad se encuentra regulada por AMPc (Nishigaki *et*

al., 2014), lo que implicaría una retroalimentación positiva del sistema y por ende una alcalinización más pronunciada. Sin embargo, para hacer esa aseveración es necesario corroborar mediante métodos bioquímicos la función como detector de AMPc del CNBD del sNHE, ya que en la literatura existen varios reportes (Dremier *et al.*, 2003; Kannan *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009, 2012; Fechner *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2015) de proteínas con CNBD que no unen nucleótidos cíclicos (NMPc), por lo que se les denominó como CNBDs no canónicos. Cabe mencionar que estos dominios también funcionan como reguladores de las proteínas que los poseen y tienen un plegamiento similar al del CNBD, pero coordinan otros ligandos (Shelver *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2013; Gianulis & Trudeau, 2013; Gianulis *et al.*, 2013; Haitin *et al.*, 2013; Fechner *et al.*, 2015).

1. 1. Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD)

Los CNBD son dominios proteicos conservados de aproximadamente 120 residuos de aminoácido (figura 1) y están presentes tanto en proteínas de organismos procariontes como de eucariontes (Shabb & Corbin, 1992). Normalmente, estos dominios se encuentran asociados a otros dominios funcionales (*i. e.* dominios catalíticos, dominios de unión a DNA, dominios para multimerización y dominios transmembranales involucrados en el transporte de iones) dentro de la misma proteína (Kannan *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2015).

Las principales funciones de los CNBD son la detección de cambios en la concentración intracelular de NMPc (principalmente AMPc y GMPc) y la regulación de la actividad de los dominios funcionales asociados (Berman *et al.*, 2005; Rehmann *et al.*, 2007; Kornev *et al.*, 2008). Estos segundos mensajeros, al unirse al CNBD, inducen en el dominio un cambio conformacional que se transmite a lo largo de la proteína, resultando en la modulación de su actividad (Berman *et al.*, 2005).

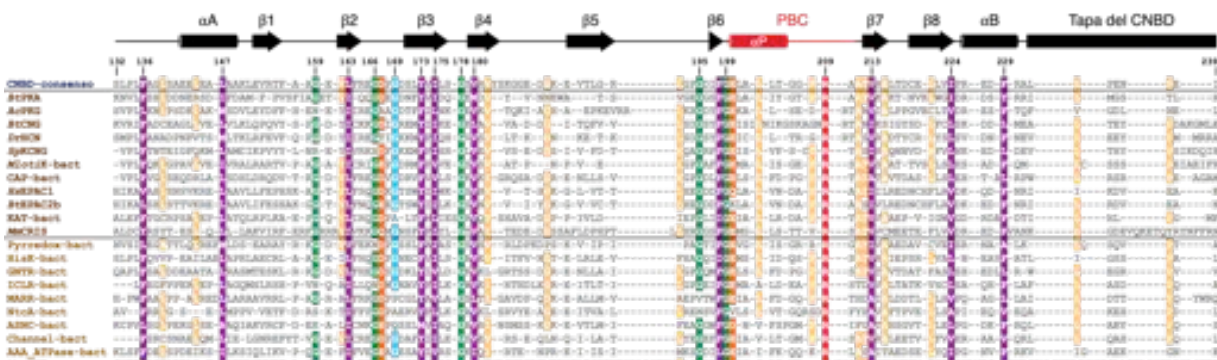


Figura 1. Características conservadas en los CNBDs.

El alineamiento jerárquico de algunas secuencias de CNBD muestra los residuos conservados del dominio. En la parte superior se indica la estructura secundaria. Los números sobre el alineamiento corresponden a la posición de los aminoácidos correspondiente al CNBD de PKA. En rojo está resaltada la arginina 209 (R209), cuyo grupo guanidino es el responsable de la interacción con el fosfato del AMPc, por lo que es uno de los residuos más conservados dentro del PBC. Los residuos de glicina que definen el núcleo estructural del CNBD están resaltados en verde. Adicionalmente, en azul, se encuentra la G169, que además de su papel estructural, se encarga de interactuar indirectamente con el fosfato del NMPc. En morado están los residuos conservados pertenecientes al núcleo hidrofóbico del dominio. En anaranjado se muestran los residuos conservados restantes (el grado de similitud es proporcional a la intensidad del color). La primera secuencia, CNBD_consensu (azul oscuro), corresponde a la secuencia consenso reportada en Kannan *et al.*, 2007. En el alineamiento, los CNBDs se encuentran separados en dos categorías, la primera (café oscuro) corresponde a los CNBDs de los que existen evidencias experimentales de su interacción con NMPcs, mientras que la segunda corresponde (café claro) a los CNBDs que carecen de caracterización bioquímica y que fueron encontrados mediante análisis de secuencias (Kannan *et al.*, 2007). En la parte inferior, se muestran los residuos conservados que representarían la secuencia firma del CNBD. El alineamiento se realizó con el programa Multialin 5. 4. 1 (Corpet, 1988).

La estructura general de los CNBDs (figura 2) se puede dividir en dos subdominios (Weber *et al.*, 1987; Kannan *et al.*, 2007), un subdominio β rígido y un subdominio helicoidal flexible y discontinuo (denominado subdominio α). El subdominio β es el más conservado de los dos (con un 35-41% de similitud en cuanto a secuencia de aminoácidos), está compuesto por un sándwich β de 8 hebras β antiparalelas con topología de remolino (del inglés “jelly-roll”), el cual forma una cavidad donde se deposita el NMPc.

Dicha unión no genera grandes cambios conformacionales dentro de este subdominio, salvo un ligero movimiento en el asa entre las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$. Esta asa se encuentra en contacto con el subdominio α , y uno de sus residuos de glicina, G169 (la numeración corresponde a la posición de los aminoácidos según el CNBD de PKA) interactúa indirectamente con el nucleótido cíclico ya que su $C\alpha$ media la

interacción CH- π con el grupo guanidino de la arginina 209 (R209), que a su vez coordina el grupo fosfato del NMPc (Kannan *et al.*, 2007).

Esta G169 junto con otras 5 glicinas (G159, G166, G178, G195 y G199) están altamente conservadas en los CNBDs (figura 1) y definen el núcleo estructural del dominio, todas ellas se encuentran localizadas en las asas que conectan las hebras β . Estas glicinas tienen una torsión ϕ positiva (la cual es una conformación energéticamente no favorable para los demás aminoácidos), lo que sugiere que están conservadas debido a que se necesitan para la correcta formación del sándwich β antiparalelo (Weber *et al.*, 1987; Kannan *et al.*, 2007). Además de las glicinas otros de los aminoácidos altamente conservados son los residuos hidrofóbicos (figura 1) que se encuentran en las hebras β 2, β 3, β 4, β 6, β 7 y β 8 (Weber *et al.*, 1987; Kannan *et al.*, 2007).

El subdominio alfa es más variable en cuanto a identidad de secuencia, también es el que experimenta más rearrreglos después de la unión con los NMPc (figura 2); está compuesto por dos motivos helicoidales (cada uno en los extremos amino y carboxilo) y por una hélice α pequeña denominada α P. El motivo helicoidal del extremo amino está compuesto por una sola hélice α llamada hélice α A, mientras que el motivo helicoidal del extremo carboxilo está compuesto, en la mayoría de los CNBD, por dos hélices α (α B y α C). A la hélice α B también se le conoce como bisagra y se encuentra inmediatamente después del sándwich β . Esta hélice presenta variaciones tanto en longitud como en secuencia; a pesar de ello se encuentra en todos los CNBDs y es la región que sufre el cambio conformacional más drástico en presencia de NMPc (figura 2) (Berman *et al.*, 2005; Rehmann *et al.*, 2006).

Después de la hélice α B continúa una región denominada tapa (Berman *et al.*, 2005). Esta región es la más variable dentro de los CNBDs, tanto en secuencia como en estructura. En la figura 2 se comparan las estructuras de los CNBDs de EPAC y la

del canal HCN. Se puede observar claramente que la tapa es totalmente diferente en estos CNBDs, ya que en EPAC está conformada por una hoja β (Harper *et al.*, 2008), mientras que en el canal HCN (y el resto de los CNBDs de los que se tiene estructura cristalográfica) tiene una conformación de hélice α , llamada α C (Rehmann *et al.*, 2006). A pesar de tan marcadas diferencias, la región de la tapa conserva su función de interactuar con la base nitrogenada del nucleótido cíclico (Rehmann *et al.*, 2007).

La pequeña hélice α P, junto con su subsiguiente asa, conforman el casete de unión a fosfato (PBC, por las siglas en inglés de “Phosphate Binding Cassette”) que se encuentra entre las hebras β 6 y β 7 del sándwich β . El PBC es un motivo conservado, cuya secuencia es FGE²⁰⁰[LIV]AL[LIMV]XXX[PV]R²⁰⁹[ATNQV]A[TSN][VIA]. Posee varios residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno con el grupo fosfato y la ribosa de los nucleótidos cíclicos. En especial, la R209 es elemental para dicha unión, ya que el grupo guanidino de su cadena lateral media la interacción con el fosfato del nucleótido (Berman *et al.*, 2005). Esta interacción también es electrostática por lo que puede ser considerada como puente salino; cabe hacer hincapié en que este aminoácido se encuentra conservado en el PBC de todos los CNBDs funcionales hasta ahora descritos (es decir los CNBDs a los que se les ha caracterizado bioquímicamente su unión específica con los nucleótidos cíclicos), pero no está ausente en todos los CNBDs que no interactúan con NMPc.

Otro de los residuos importantes para la interacción con los nucleótidos cíclicos es el ácido glutámico 200 (E200), el cual interactúa con la ribosa del nucleótido y al mismo tiempo forma puentes de hidrógeno con residuos de la tapa (Kannan *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2015). A diferencia de la R209, el E200 no está totalmente conservado en los CNBDs caracterizados; en algunos casos la posición está ocupada por aminoácidos similares como el ácido aspártico.

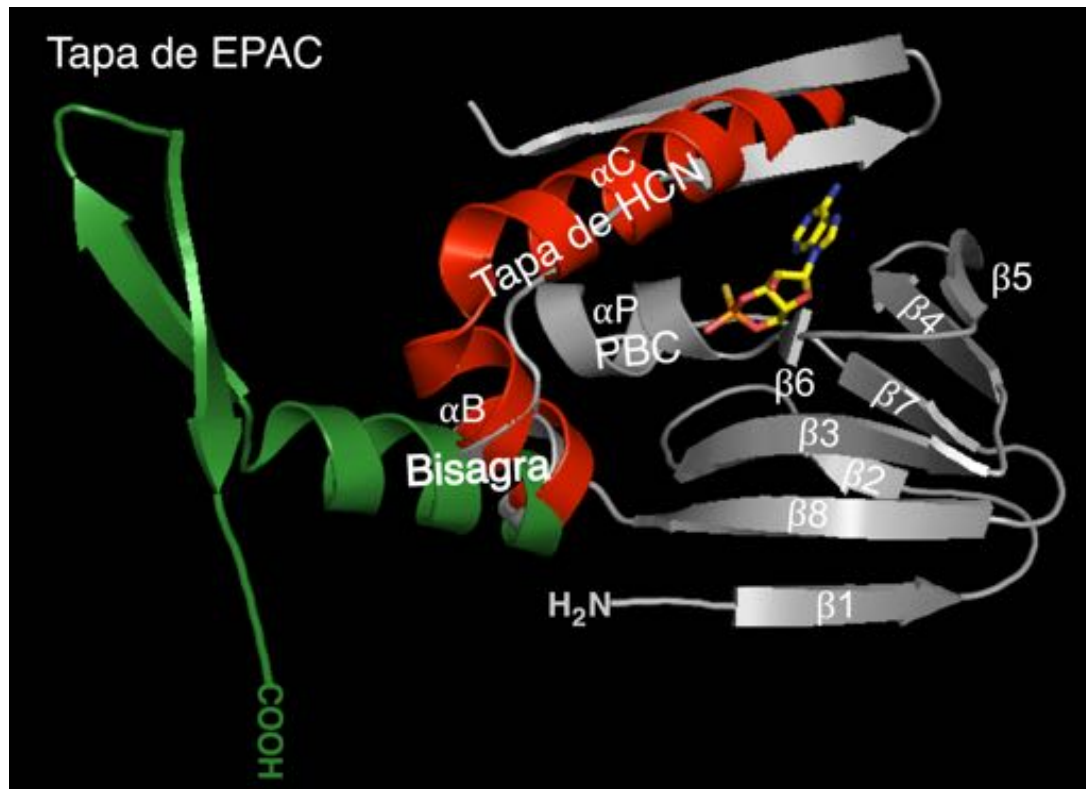


Figura 2. Comparación estructural de los CNBD de EPAC y HCN.

El CNBD de EPAC (verde) está en su conformación libre de AMPc y en presencia de AMPc (gris). El CNBD del canal HCN se encuentra en su conformación unido a AMPc (rojo), los dominios se encuentran superpuestos. El CNBD de EPAC es muy parecido al del canal HCN a excepción de la región de la tapa, ya que difiere totalmente en estructura y secuencia. Los dominios CNBD han evolucionado de tal manera que al interactuar con el nucleótido cíclico experimentan un cambio conformacional. Esto se puede ver en el movimiento de la hélice αB también llamada bisagra. (Imagen basada en Rehmann *et al.*, 2006 y creada en MacPyMOL).

Entre las proteínas hasta ahora identificadas que contienen un CNBD capaz de unir nucleótidos cíclicos se encuentran el factor de transcripción bacteriano activado por catabolitos CAP (también conocido como CRP, proteína receptora de AMPc) (McKay & Steitz, 1981), las cinasas dependientes de AMPc y GMPc (PKA y PKG, respectivamente) (Canaves & Taylor, 2002; Huang *et al.*, 2014), los canales iónicos regulados por NMPc (CNG) (Craven & Zagotta, 2006), los canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por NMPc (HCN) (Zagotta *et al.*, 2003), los canales iónicos permeables a K^+ y regulados por nucleótidos cíclicos (KCNG) (Galindo *et al.*, 2000, 2007; Strünker *et al.*, 2006; Bönigk *et al.*, 2009), el canal iónico bacteriano *MlotiK*, las proteínas dependientes de AMPc que intercambian nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas (EPAC) (Kawasaki *et al.*, 1998;

Rehmann *et al.*, 2003), la lisinacetiltransferasa de *Mycobacterium sp.* (KAT) (Nambi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012) y la proteína específica del espermatozoide con función desconocida CRIS (Krähling *et al.*, 2013).

Hasta la fecha se han identificado, mediante análisis bioinformático 13,667 proteínas con CNBD (Mohanty *et al.*, 2015). Estos CNBD están clasificados en 135 subfamilias según su similitud de secuencia y por los dominios funcionales a los que se encuentran asociados (Shabb & Corbin, 1992; Kannan *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2015). Estos análisis revelaron que los CNBDs también están presentes en transportadores ABC, transportadores de sulfato, ATPasas, proteínas del complejo de secreción tipo I, histidincinasas, lisofosfolipasas, fosfatasas, nucleotidiltransferasas, hidrolasas de acil-CoA y oxidorreductasas (Mohanty *et al.*, 2015).

Aunado a la identificación y clasificación de estas secuencias, se observa que los CNBDs han conservado preferentemente los residuos estructurales (las G en las asas entre dos hebras β y el patrón de residuos hidrofóbicos). Sin embargo, en el resto de la secuencia existe una enorme variabilidad (Kannan *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2015). Estas variaciones se encuentran principalmente en el extremo amino antes de la hélice αA , en la región comprendida desde el asa $\beta 4$ - $\beta 5$ hasta el final de la hebra $\beta 5$, en el PBC y en la αC (Mohanty *et al.*, 2015).

La variabilidad en la secuencia del extremo amino y carboxilo del dominio se debe principalmente a que cada proteína ha desarrollado su propio mecanismo para la transmisión del cambio conformacional del CNBD, inducido por NMPc, al resto de la proteína (Berman *et al.*, 2005). En el caso de las variaciones en el asa $\beta 4$ - $\beta 5$ y la hebra $\beta 5$ se explican, probablemente, porque ambas se encuentran expuestas hacia el solvente, por lo que la conservación de sus secuencias no es esencial para la estabilidad del dominio (Weber *et al.*, 1987).

Por otra parte, se ha observado que las variaciones dentro del PBC repercuten en la funcionalidad del dominio modificando su afinidad y especificidad. Existen reportes donde mutaciones en la R209 aumentan la K_d en un orden de magnitud e incluso abolen la interacción con los NMPc (Bubis *et al.*, 1988; Harzheim *et al.*, 2008) y se sabe que la especificidad entre AMPc y GMPc depende, respectivamente, de la presencia de un residuo de alanina o treonina en la posición 210 del CNBD (Weber *et al.*, 1989; Altenhofen *et al.*, 1991; Kumar & Weber, 1992).

Además, se han reportado CNBDs con PBCs no conservados que tienen una interacción nula con cualquier NMPc (Lanzilotta *et al.*, 2000; Dremier *et al.*, 2003; Kuiperij *et al.*, 2003; Joyce *et al.*, 2006; Brelidze *et al.*, 2009). Incluso, para algunos de ellos, se ha reportado que interaccionan con otro tipo de ligandos aunque el dominio mantiene la misma estructura global (Lanzilotta *et al.*, 2000; Joyce *et al.*, 2006). Este último punto sugiere que el CNBD no es solamente un dominio regulatorio capaz de detectar nucleótidos cíclicos (CNBD canónico), sino que, conservando el mismo plegamiento, también ha evolucionado como una estructura versátil de detección de diversos tipos de moléculas involucradas en la transducción de señales. A este tipo de dominios se les denominó como CNBDs no canónicos.

1. 2. CNBDs no canónicos

Durante la evolución, las proteínas con CNBD han sufrido una gran divergencia funcional debida mutaciones, inserciones y deleciones específicas en los motivos conservados. Un claro ejemplo se muestra con las proteínas CooA (activador transcripcional dependiente de monóxido de carbono) y CprK (regulador transcripcional de la deshalogenasa reductora de o-clorofenol), que junto con CAP, pertenecen a la superfamilia de factores transcripcionales bacterianos CRP/FNR (regulador de la fumarato/nitrato reductasa). Esta familia de proteínas está involucrada en la regulación positiva de genes involucrados en las respuestas a señales extracelulares hostiles, como cambios en la presión de O_2 o la baja

concentración de nutrientes, brindándole a la bacteria una versatilidad metabólica para poder sobrevivir.

CAP, CooA y CprK son proteínas diméricas que conservan una estructura en común (Lanzilotta *et al.*, 2000; Joyce *et al.*, 2006), tienen un dominio detector de moléculas pequeñas en el amino terminal y un dominio de unión a DNA en el carboxilo terminal. En todos los casos, cuando el efector se une inicia un cambio conformacional que se transmite a toda la proteína, promoviendo que el dominio de unión a DNA pueda unirse específicamente y con gran afinidad a la región promotora, permitiendo la transcripción de los genes que regula (Popovych *et al.*, 2009). Para CAP, la molécula efectora es el AMPc y el dominio detector es un CNBD canónico con el residuo R209 conservado (la R ocupa la posición 82 en la secuencia de CAP).

En el caso de CooA, su molécula efectora es el monóxido de carbono (CO) y el dominio detector es un CNBD no canónico, que posee un residuo de histidina (H77, numeración correspondiente a la secuencia de CooA) en una posición estructuralmente análoga a la ocupada por la R209 en PKA (figura 3). En la estructura cristalográfica, la H77 se encuentra coordinando a un grupo hemo, el cual se encuentra en la cavidad formada por el sándwich β (donde se une el NMPc en los CNBDs canónicos). El grupo hemo es el que se encarga de detectar al CO (Lanzilotta *et al.*, 2000) y al unirse éste, se induce un cambio conformacional que activa a la proteína (Lanzilotta *et al.*, 2000; Borjigin *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2009). Este factor transcripcional se encarga de regular positivamente la expresión de genes involucrados en la oxidación del CO para obtener energía en ambientes anaeróbicos.

Asimismo, el factor transcripcional CprK posee también un CNBD no canónico, pero en este caso la posición de la R209 del PBC está ocupada por un residuo de asparagina (N92, numeración correspondiente a la secuencia de CprK).

La N92 forma puentes de hidrógeno con compuestos aromáticos halogenados (figura 3), como el ácido orto-clorofenolacético (OCPA), el cual es el ligando de CprK (Levy *et al.*, 2008). De igual manera que en los casos anteriores, la unión del ligando induce un cambio conformacional, pero en este caso permite que el dominio de unión a DNA interactúe con los promotores de genes involucrados en la halorrespiración (Joyce *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2008; Kemp *et al.*, 2013).

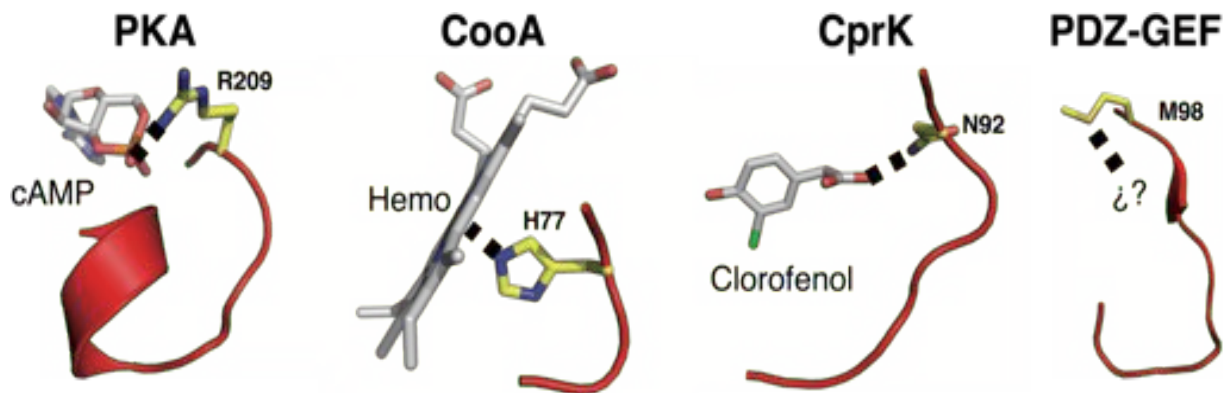


Figura 3. Comparación entre los PBC de PKA y el de los CNBDs no canónicos.

Se muestra el PBC de PKA y su región homóloga en CooA, CprK y PDZ-GEF, con sus respectivos ligandos. En el CNBD de PKA, el residuo encargado de formar puentes de hidrógeno con el AMPc es la arginina 209 (R209). En el caso de CooA, la histidina 77 (H77) ocupa la posición donde se encontraría la R209; es interesante que ese residuo se encarga de la interacción con el grupo hemo, el cual es el ligando de CooA. De igual manera, para CprK, esa misma posición está ocupada por una asparagina (N92) que interacciona con moléculas de clorofenol, el cual es el ligando de este factor de transcripción. Por último, se muestra la región análoga de PDZ-GEF, para la cual no se conoce su ligando fisiológico, pero se propone que éste interaccionaría con la metionina 98. (Imagen modificada de Kannan *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se cuenta con la estructura cristalográfica de otras tres proteínas con dominios tipo CNBD que no están reguladas por nucleótidos cíclicos y para las que tampoco se conoce su ligando fisiológico. La primera es PrfA, proteína que también pertenece a la familia de los factores de transcripción CRP/FNR; está involucrada en la regulación positiva de los genes de virulencia de la isla de patogenicidad 1 (LIPI-1) de *Listeria monocytogenes*, y al igual que CooA, CAP y CprK adopta dos conformaciones, una interacciona específicamente con el DNA promoviendo el inicio de la transcripción y la otra no (Won *et al.*, 2009). Aunque no se conoce su ligando fisiológico, estudios bioquímicos y estructurales indican

fuertemente que el cambio entre conformaciones se debe a la interacción del sándwich β con una molécula pequeña (Eiting *et al.*, 2005; Deshayes *et al.*, 2012).

La segunda es la proteína de eucariontes PDZ-GEF, la cual está estrechamente relacionada con EPAC. Ambas son factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, pero sólo EPAC está regulado directamente por AMPc (Kuiperij *et al.*, 2006). De hecho, en la figura 3 se puede observar que un residuo de metionina (M98) ocupa el lugar de la arginina de los CNBD canónicos (Kannan *et al.*, 2007).

La tercera es la proteína de función desconocida CBNL de *Brucella abortus*, la cual tiene un CNBD parecido al de PKG y aunque conserva el residuo de arginina clave para la unión con NMPc no coordina GMPc ni AMPc (He *et al.*, 2015).

1. 3. Dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD)

Además de los CNBDs no canónicos mencionados en la sección anterior, recientemente se renombró a un grupo de CNBDs que no coordinan NMPc como dominios homólogos al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD). Los CNBHD se encuentran en el extremo carboxilo de las proteínas de la subfamilia de canales iónicos KCNH, que comprende a los canales *ether-a-gò-gò* (EAG), los canales de K⁺ parecidos a EAG (ELK, “EAG-like potassium channel”) y los canales iónicos relacionados al gene EAG (ERG, “EAG related gene”) (Brelidze *et al.*, 2009, 2012; Schünke & Stoldt, 2013).

Esta familia de canales está estrechamente emparentada y tiene una topología similar a la de los canales HCN y CNG, los cuales tienen un CNBD canónico y su apertura está modulada por NMPc. Por tal similitud se llegó a considerar a los KCNH como blancos de AMPc o GMPc

Sin embargo en la literatura existían datos contradictorios sobre su regulación directa por NMPc, ya que algunos grupos habían demostrado mediante ensayos

electrofisiológicos en célula completa que los canales EAG de *Drosophila* (Brüggemann *et al.*, 1993; Zhong & Wu, 1993) y los ERG de humano estaban regulados por AMPc (Cui *et al.*, 2000, 2001), mientras que otros grupos demostraron lo opuesto registrando la actividad de los canales de parches escindidos en configuración “inside-out” (Ludwig *et al.*, 1994; Sanguinetti *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1996; Frings *et al.*, 1998). No fue hasta que se realizaron ensayos bioquímicos con los dominios aislados que se comprobó que el dominio CNBHD de EAG y ERG tienen, respectivamente, nula y baja afinidad ($K_d = 51 \mu\text{M}$) a los NMPc (Brelidze *et al.*, 2009).

Aunado a esto, en los últimos años se han reportado varias estructuras cristalográficas de las regiones citoplasmáticas de los canales KCNH (Brelidze *et al.*, 2012, 2013; Marques-Carvalho & Morais-Cabral, 2012; Marques-Carvalho *et al.*, 2012; Haitin *et al.*, 2013). La primera fue la del canal ELK del pez cebra (zELK) (Brelidze *et al.*, 2012), con la que se demostró que la estructura global del dominio CNBHD de zELK (figura 4) es similar a la de los CNBD canónicos, pero no posee un sándwich β adecuado para la unión con los NMPc.

Esto se debe a que el perfil electrostático de la cavidad donde se embebe el NMPc es negativo, lo cual no es favorable para la unión del NMPc pues éste posee carga negativa debido al grupo fosfato. Aunado a esto, el sitio está ocupado por una hebra β pequeña del propio canal, denominada β_9 (figura 4), que se propone funciona como un ligando intrínseco, el cual podría ser desplazado por un ligando fisiológico aún no caracterizado y modular la actividad del canal (Brelidze *et al.*, 2012).

La existencia de los CNBHD y los CNBDs no canónicos muestran claramente que la presencia de un CNBD predicho por análisis bioinformático no significa necesariamente que el dominio pueda unir NMPc, por lo que se necesita realizar una

caracterización bioquímica para determinar realmente cuáles dominios sí interaccionan con NMPc.

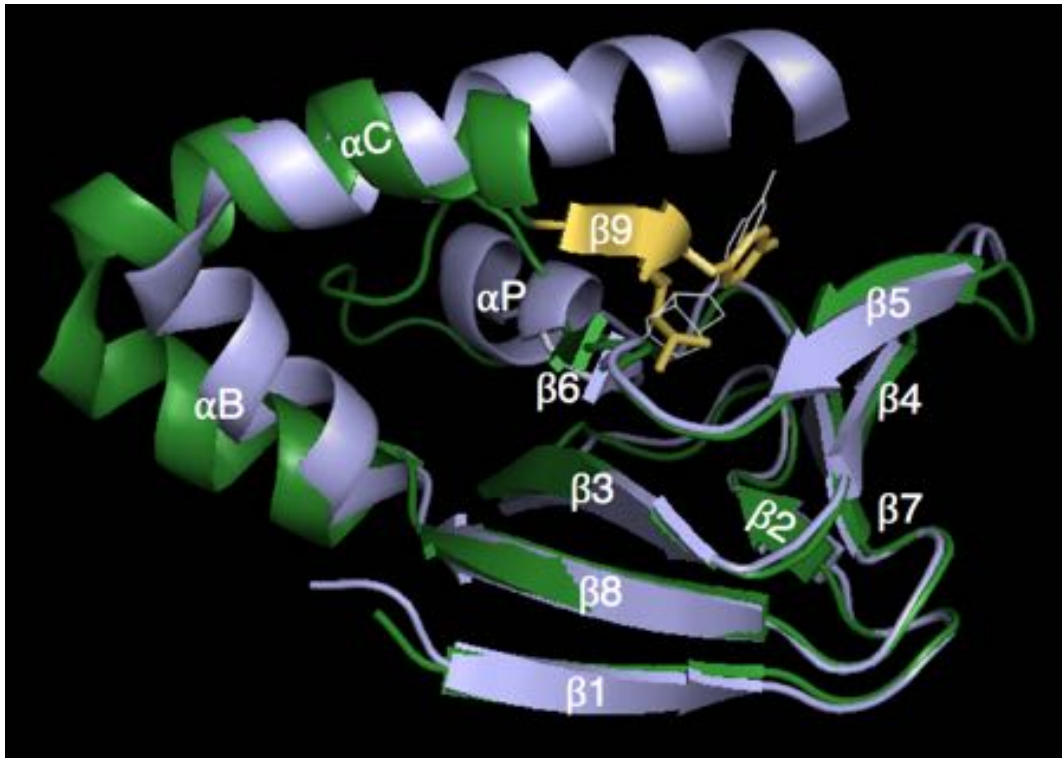


Figura 4. Comparación estructural entre el CNBD de HCN2 y el CNBHD de zELK.

A pesar de que la estructura global del CNBHD de zELK (verde) es similar al CNBD de HCN (lila), la superposición de las dos estructuras revela diferencias marcadas, principalmente en la posición de las hélices α . Además la hélice αC es más corta y está ligeramente curvada, y al final de esta se encuentra una hebra pequeña ($\beta 9$, amarillo). De manera interesante, el anillo fenólico de la tirosina presente en la $\beta 9$ está en el lugar donde se posicionaría el anillo de purina del AMPc (blanco), mientras que la leucina está en donde debería de estar el fosfato.

2. ANTECEDENTES

Recientemente, en nuestro grupo, desarrollamos un ensayo de unión entre un CNBD y un NMPc mediante FRET (del inglés “Förster Resonance Energy Transfer”). A continuación se describirá brevemente el fenómeno de FRET con sus bases teóricas, para posteriormente explicar el ensayo de unión con sus ventajas y desventajas.

2. 1. FRET

FRET es un fenómeno cuántico descrito por primera vez a mediados de la década de los 40 por el científico alemán Theodor Förster (Lakowicz, 2006). Durante este fenómeno ocurre transferencia de energía mediante resonancia entre un fluoróforo donador en un estado electrónico excitado y un cromóforo o fluoróforo aceptor en su estado basal (figura 5).

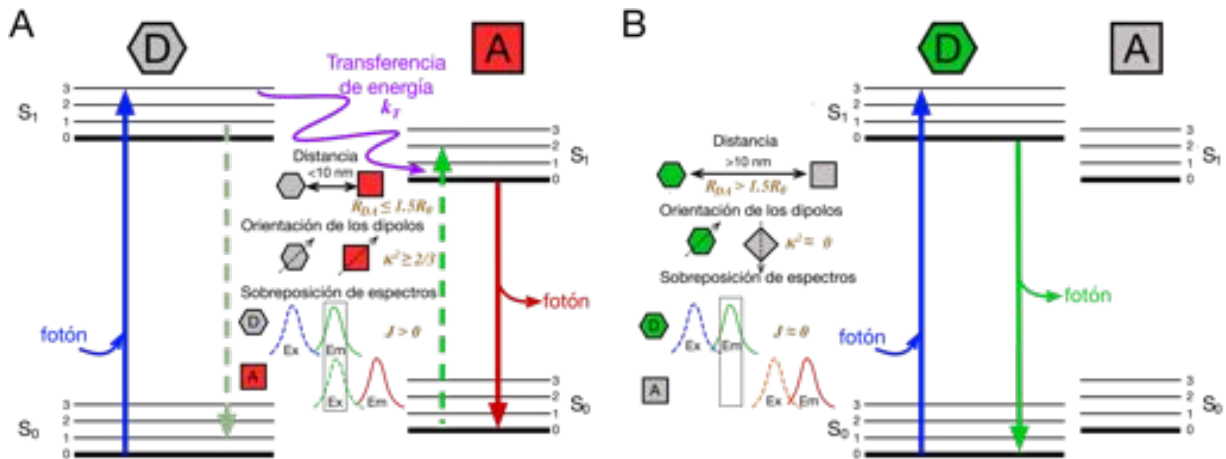


Figura 5. FRET y diagrama de Jablonski simplificado.

Se representan los estados electrónicos basales (S_0) y excitados (S_1) junto con sus respectivos subniveles vibracionales de dos moléculas fluorescentes que representan al donador (D) y al aceptor (A) en un par FRET. En el panel A ocurre transferencia de energía ya que el donador absorbe un fotón que lo lleva a su estado excitado (flecha azul), el fluoróforo donador regresa a su estado basal sin emitir un fotón (línea punteada, verde oscuro) después de transferir su energía al aceptor. La molécula aceptorra llega a su estado excitado por la transferencia de esta energía y sin absorber fotones (línea punteada, verde claro), regresa a su estado basal emitiendo un fotón de menor energía que el absorbido por el donador (línea roja). En este caso, los dos fluoróforos se encuentran a una distancia menor a 10 nm, sus dipolos son paralelos y existe una sobreposición del espectro de emisión del donador con el de excitación del aceptor. En el panel B, no hay transferencia de energía debido a que los dos fluoróforos están muy alejados uno del otro, sus dipolos no están orientados ni hay una sobreposición entre sus espectros. R_{DA} es la distancia que hay entre el donador y el aceptor; R_0 es la distancia de Förster para ese par FRET; k^2 es el factor de orientación de los dipolos de los fluoróforos y J es la integral de la sobreposición del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor.

El flujo de la transferencia de energía va de la molécula donadora hacia la aceptora y sucede de manera no radiativa, es decir, la molécula donadora no emite fotones que son absorbidos por el aceptor (Piston & Kremers, 2007). En realidad, la transferencia de energía sucede mediante la interacción de los dipolos oscilatorios de las moléculas, por lo que éstos deben de oscilar en las mismas frecuencias (Lakowicz, 2006; Clegg, 2009).

El resultado de la transferencia de energía se ve reflejado en la disminución de la eficiencia cuántica¹ (Φ_D) y en el decremento del tiempo de vida media del donador² (τ_D), por lo que se observa una disminución en su intensidad de fluorescencia³. En el caso de que la molécula aceptora sea también un fluoróforo, éste emitirá un fotón para regresar a su estado basal, es decir que se observará un aumento en la fluorescencia del aceptor (Braslavsky *et al.*, 2008).

La velocidad de transferencia de energía (k_T) depende de las características espectroscópicas de los fluoróforos, de su posición y orientación con respecto uno del otro y de factores del medio. Förster dedujo teóricamente que la k_T estaba dada por la ecuación 1, ofreciendo algunos experimentos que avalaban su teoría.

$$k_T = \frac{\Phi_D \kappa^2}{\tau_D R_{DA}^6} \frac{(9 \ln 10)}{128 \pi^5 N_A n^4} J \quad (1)$$

Donde Φ_D es la eficiencia cuántica del donador en ausencia del aceptor, por lo que entre más cercano sea su valor a 1 mayor será la transferencia de energía; κ^2 es el factor de orientación⁴ de los dipolos de emisión y absorción del donador y

¹ Eficiencia cuántica o rendimiento cuántico (Φ). Es la relación entre el número de fotones emitidos respecto al número de fotones absorbidos, los valores que puede tomar van de 0 a 1.

² Tiempo de vida media (τ). Es el tiempo promedio en que un fluoróforo pasa en el estado excitado antes de volver al estado basal. Generalmente sus valores están en el rango de picosegundos a cientos de nanosegundos.

³ Fluorescencia. Es un proceso de emisión de luz en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de fotones. Las especies excitadas se relajan a su estado basal liberando su exceso de energía mediante la emisión de un fotón con menor energía que el absorbido.

⁴ El factor de orientación κ^2 , depende de la posición en el espacio de los dipolos y de los ángulos que existen entre ellos; puede tomar valores en un rango de 0 a 4, donde 0 significa que los dipolos están orientados perpendicularmente, en este caso no habría FRET. Mientras que un valor de 4 significa que son paralelos en el mismo plano y se encuentran totalmente alineados uno detrás del otro, un valor de 1 significaría que los dipolos son paralelos, pero uno a lado del otro. Debido a que la mayoría de los fluoróforos se usan en solución, se utiliza un factor de orientación de 2/3, el cual representa el valor promedio de todas las orientaciones posibles que pueden tener los dipolos en un momento dado.

aceptor, respectivamente; τ_D es el tiempo de vida media del donador en ausencia del aceptor; R_{DA}^6 es la distancia entre el donador y el aceptor elevada a la sexta potencia; N_A es el número de Avogadro (6.022×10^{23} moléculas/mol); n^4 es el índice de refracción del medio elevado a la cuarta potencia; J es la integral de la sobreposición de los espectros y se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} \quad (2)$$

Donde $F_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia del donador en la longitud de onda λ y $\varepsilon_A(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar del aceptor en la longitud de onda λ . La ecuación 2 representa la sobreposición del espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor modificada por un factor de λ^4 . Esta sobreposición es un requisito esencial para que ocurra FRET.

Una expresión alternativa para la velocidad de transferencia de energía está dada por:

$$k_T = k_D \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad (3)$$

En esta ecuación se observan dos nuevos términos; k_D es la constante de decaimiento del donador en su estado excitado y es el inverso del τ_D , mientras que R_0 es la distancia de Förster, la cual es la distancia crítica a la que el 50% de la energía de excitación es transferida al aceptor, es decir hay una eficiencia del 50% en la transferencia (Lakowicz, 2002).

El término R_0 define la relación espacial entre el cromóforo del donador y del aceptor, en la cual la probabilidad de relajación del donador mediante la transferencia de energía por resonancia es igual a la probabilidad de relajación por cualquier otro proceso que pueda ocurrir. Este valor depende de las características de los fluoróforos de cada par FRET y se puede calcular si combinamos las ecuaciones 1 y 3.

$$R_0^6 = \frac{(9 \ln 10) \Phi_D \kappa^2}{128 \pi^5 N_A n^4} J \quad (4)$$

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 (n^{-4} \Phi_D \kappa^2 J)^{1/6} \quad (5)$$

La ecuación 5 es sólo una representación sencilla y útil de la ecuación 4, ya que da directamente la distancia en Å, pero sólo es válida si J se expresa en $M^{-1}cm^3$. Para esto, J se tiene que calcular usando $M^{-1}cm^{-1}$ para el coeficiente de extinción molar y cm para las longitudes de onda.

Es importante recalcar que en las ecuaciones 1 y 3 se observa que la transferencia de energía es altamente dependiente de la distancia entre el donador y el aceptor ya que es proporcional a R_{DA}^{-6} . A pesar de su gran dependencia por la distancia, este fenómeno no es colisional y sucede solamente en un rango de distancias de 1 nm a 10 nm, aproximadamente (Lakowicz, 2006). Esto es porque a distancias menores las moléculas de donador y aceptor llegan a formar complejos, ya que sus nubes de electrones podrían interactuar entre sí, por lo que ocurriría otro tipo de fenómenos como el intercambio de electrones tipo Dexter (también conocido como transferencia de energía de Dexter) y el apagamiento estático de la fluorescencia del donador. En cambio, a distancias mayores se llega a la zona radiativa del campo electromagnético, donde la emisión y absorción de fotones se lleva a cabo (Medintz & Hildebrandt, 2013).

De manera interesante, el rango de distancias en el que sucede el fenómeno de FRET es de suma importancia biológica, ya que dentro de él se encuentra el tamaño promedio de las biomoléculas, las distancias entre las subunidades de las proteínas multiméricas y el grosor de la membrana lipídica. Por lo anterior, se ha utilizado al fenómeno de FRET como una regla molecular y como una herramienta para medir interacciones moleculares (Lakowicz, 2006; Nishigaki & Treviño, 2012). Esto se logra calculando la eficiencia de la transferencia de energía (E), es decir, la

fracción de fotones que son absorbidos por el donador y que son transferidos al aceptor. La expresión formal para la eficiencia de FRET es:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_D} \quad (6)$$

Por lo que podemos deducir que si la transferencia de energía (k_T) sucede más rápido que la tasa de decaimiento del donador ($k_D = \tau_D^{-1}$), la eficiencia será grande. En el caso contrario, si la k_T es más lenta que la k_D , habrá muy poca transferencia de energía cuando el donador se encuentre en el estado excitado, por lo que el FRET será ineficiente. Por ello es indispensable que el τ_D sea lo suficientemente largo para que pueda ocurrir FRET.

Experimentalmente, la eficiencia de FRET se obtiene midiendo la intensidad de fluorescencia del donador en presencia (F_{DA}) y ausencia del aceptor (F_D) y sacando su cociente.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (7)$$

Del mismo modo, se puede obtener midiendo el tiempo de vida media del donador en presencia (τ_{DA}) y ausencia del aceptor (τ_D).

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (8)$$

Si combinamos las ecuaciones 3 y 6 podemos calcular la eficiencia de FRET (E) en función de la distancia que hay entre el donador y el aceptor.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} \quad (9)$$

De esta manera, si determinamos la eficiencia de FRET experimentalmente y conocemos la distancia de Förster (R_0) del par FRET podríamos calcular la distancia entre dos fluoróforos.

2. 2. Ensayo de unión tipo FRET

En nuestro grupo desarrollamos un ensayo de unión entre un CNBD y AMPc registrando los cambios en la fluorescencia debidos al FRET intermolecular. Para esto utilizamos como aceptor a un análogo fluorescente de AMPc, el cual está marcado con fluoresceína en el carbono 8 de su base nitrogenada (8-[Fluo]-AMPc).

Como donador utilizamos a la proteína fluorescente (FP) mECFP (variante monomérica mejorada de la proteína cian fluorescente), la cual fusionamos al extremo carboxilo de la hélice B del CNBD de EPAC I (denominamos a la proteína quimérica EPAC-CFP). El CNBD en la construcción tiene 36 aminoácidos extra en su extremo amino que corresponden a un manojito de hélices α que conectan al CNBD con el dominio DEP en la proteína completa. La presencia del manojito de hélices α le da cierta estabilidad al dominio y se ha observado que incrementa su nivel de expresión y su solubilidad al purificarlo (Kraemer *et al.*, 2001). De hecho, esta misma extensión del CNBD fue utilizada en el sensor fluorescente EPAC-cAMPs (Nikolaev *et al.*, 2004).

El ensayo consistía básicamente en adquirir el espectro de emisión del donador en presencia y ausencia del aceptor y calcular su eficiencia de FRET. Además, para comprobar la especificidad de la unión, realizamos un ensayo de competencia con 8-CPT-AMPc, un análogo no fluorescente de AMPc (figura 6).

Al realizar el ensayo con la proteína recombinante pudimos observar que la fluorescencia del donador (EPAC-CFP) disminuía en presencia del aceptor (8-[Fluo]-AMPc), debido a que ocurría transferencia de energía entre estos dos fluoróforos. Estos resultados indicaban que el AMPc marcado (8-[Fluo]-AMPc) sí interactuaba con el CNBD de EPAC I.

Además determinamos que la interacción era específica, ya que en el ensayo de competencia pudimos registrar que la fluorescencia del donador regresaba a su nivel original, ya que el exceso de AMPc no fluorescente desplazaba casi por

completo al aceptor. Asimismo, logramos realizar los ensayos a concentraciones menores a 10 nM e incluso con proteína no purificada, lo que disminuyó el tiempo de trabajo experimental y el uso de reactivos.

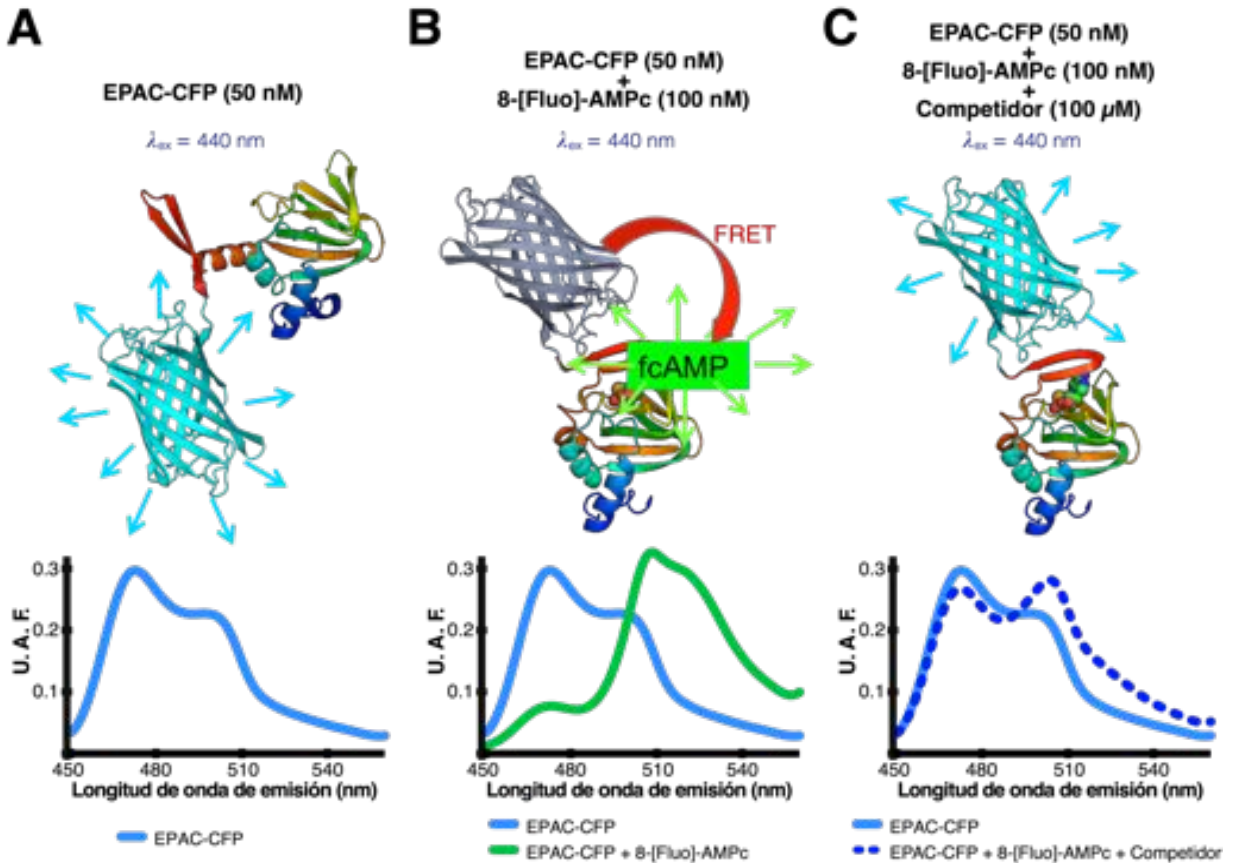


Figura 6. Ensayo de unión tipo FRET.

En la parte superior, se muestran las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo; para todos los casos se utilizó una luz de excitación de 440 nm. En la parte de en medio está la representación esquemática del ensayo y en la parte inferior los espectros de cada condición (en todos se muestra en línea continua y azul claro el espectro del donador en ausencia del aceptor para comparación). En el panel A se muestra solamente al donador, es decir la proteína quimérica EPAC-CFP. Como el ensayo se realizó con una luz de excitación de 440 nm, vemos la emisión de CFP con su característico espectro de dos picos. En el panel B, se muestra la condición de donador en presencia del aceptor (8-[Fluo]-AMPc; color verde); como hay unión entre el CNBD de EPAC I y el análogo de AMPc, los fluoróforos se acercan lo suficiente para que ocurra FRET. Por lo tanto, en la gráfica de los espectros vemos una reducción en la fluorescencia del donador y un incremento en la fluorescencia del aceptor. En el panel C se muestra el ensayo de competencia; la línea discontinua de color azul muestra la mezcla de EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPc más competidor, por lo que vemos que la fluorescencia del donador se recupera ya que el exceso de AMPc no fluorescente desplaza al aceptor.

A pesar de la facilidad del ensayo, éste tiene un gran inconveniente, ya que la luz de excitación utilizada para el donador ($\lambda_{ex}=440$ nm), también excita directamente, aunque en menor medida pero de manera significativa, al aceptor 8-

[Fluo]-AMPc (figura 7A). Por lo tanto, una fracción de la fluorescencia del aceptor se debe a la excitación directa por la luz de excitación y no por FRET (figura 7B).

Este problema parece trivial si el ensayo se realiza en solución dentro de una celdilla y con la proteína purificada, ya que el experimentador puede ajustar fácilmente la concentración de donador y aceptor. Sin embargo, si este mismo ensayo quisiera realizarse en células de cultivo con un sistema de microscopía de fluorescencia o con un lector de placas, sería prácticamente imposible determinar la proporción real de donador y aceptor. Esto complicaría el análisis e interpretación de los datos, ya que la forma del espectro en la condición con competidor varía dependiendo de la proporción de donador:aceptor (figura 7C).

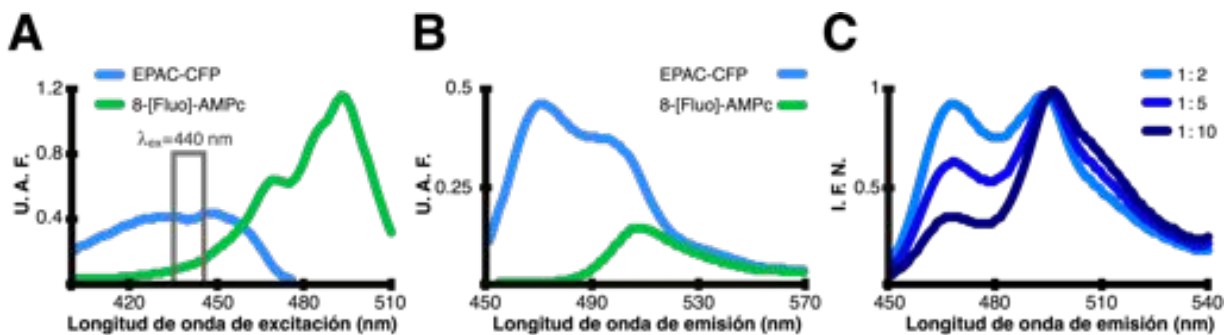


Figura 7. Desventajas del par FRET EPAC-CFP 8-[Fluo]-AMPc.

(A) Se muestran los espectros de excitación de EPAC-CFP (100 nM, línea azul) y 8-[Fluo]-AMPc (100 nM, línea verde). El recuadro gris muestra la longitud de onda de excitación (440 nm) que se usa durante el ensayo de unión. Para poder comparar los espectros, éstos se registraron utilizando la longitud de onda de emisión correspondiente al 85 % de la emisión máxima de cada uno de los fluoróforos, es decir, se tomó el espectro de excitación a una longitud de onda de emisión de 485 nm para EPAC-CFP y 515 nm para 8-[Fluo]-AMPc. El panel B corresponde a los espectros de emisión tomados con la longitud de onda de excitación utilizada durante los ensayos de unión (440 nm), se puede observar que el pico de emisión de 8-fluo-AMPc corresponde a la tercera parte de la intensidad máxima de EPAC-CFP. En el panel C se muestran los espectros de emisión normalizados de los ensayos de unión en presencia de competidor a distintas proporciones de donador y aceptor.

En un esfuerzo por optimizar las condiciones del ensayo con este par FRET utilizamos una fuente de luz con longitudes de onda más cortas, pero incluso en estas condiciones ocurría una excitación basal del aceptor. Además, se perjudicaba el cociente señal/ruido, ya que la excitación de EPAC-CFP era ineficiente.

Por lo anterior, decidimos abordar el problema utilizando una nueva combinación de fluoróforos en la cual el donador tuviera un mayor corrimiento de

Stokes⁵, ya que de esa manera evitaríamos que la luz de excitación usada para el ensayo excitara directamente al aceptor. Hasta el momento, sólo existen cinco proteínas fluorescentes (FPs) con un corrimiento de Stokes grande: T-Sapphire, mAmetrine, LSSmOrange, LSSmKate y mKeima (Zapata-Hommer & Griesbeck, 2003; Kogure *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2008; Piatkevich *et al.*, 2010; Shcherbakova *et al.*, 2012). De éstas, mAmetrine y T-Sapphire tienen la eficiencia cuántica (Φ) más grande (tabla 1), característica que es indispensable para que un fluoróforo sea un buen donador. De estas dos proteínas, mAmetrine presenta un corrimiento de Stokes mayor, además posee un tiempo de maduración menor y una mayor fotoestabilidad (tabla 1), las cuales son características deseables para cualquier proteína fluorescente. Por lo anterior, seleccionamos a mAmetrine como el donador del nuevo par FRET.

Tabla 1. Características de las FPs con un corrimiento de Stokes grande.

Proteína fluorescente	Pico de Excitación (Ex _{λ_{\max}} , nm)	Pico de Emisión (Em _{λ_{\max}} , nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ	Brillo relativo a EGFP	Fotoestabilidad (s) ^A	Maduración (h) ^B	pK _a ^C
T-Sapphire	399	510	44,000	0.60	0.80	9	1.3	5.7
mAmetrine	406	526	45,000	0.58	0.79	10	0.8	6.2
LSSmOrange	437	572	52,000	0.45	0.69	10	2.3	5.7
LSSmKate2	460	605	26,000	0.17	0.13	25	2.5	2.7
mKeima	440	620	13,400	0.24	0.10	9	4.4	6.0

^A Tiempo medio. ^B Tiempo medio de maduración a 37 °C. ^C pH al cual la fluorescencia disminuye un 50 % con respecto al máximo.

2.3. Proteína fluorescente mAmetrine

mAmetrine es una variante de la proteína verde fluorescente silvestre de la medusa *Aequorea victoria* (wtGFP), obtenida mediante varias rondas de mutagénesis al azar y sitio dirigidas (Ai *et al.*, 2008). Tal como la wtGFP, está formada por 238 aminoácidos (Prasher *et al.*, 1992) y dentro de su secuencia se

⁵ Corrimiento de Stokes. Es la diferencia que existe entre la energía de los fotones absorbidos y la energía de los fotones emitidos, es decir la separación entre el pico del espectro de excitación y el de emisión. El corrimiento se debe a la pérdida de energía durante el estado excitado, por eso los fluoróforos emiten a una longitud de onda mayor que la luz que absorben.

encuentra toda la información necesaria para la formación postraduccional y autocatalítica del cromóforo (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye & Tsuji, 1994).

Todas las proteínas fluorescentes tienen una estructura de barril β compuesto por 11 hebras β antiparalelas (figura 8A), formando un cilindro compacto y casi perfecto con dimensiones de 4.2 nm de largo y 2.5 nm de diámetro (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Además, poseen cuatro hélices α pequeñas que cubren la parte superior del cilindro y una hélice α central que atraviesa el barril a lo largo, localizando al cromóforo prácticamente en el centro de la proteína (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996).

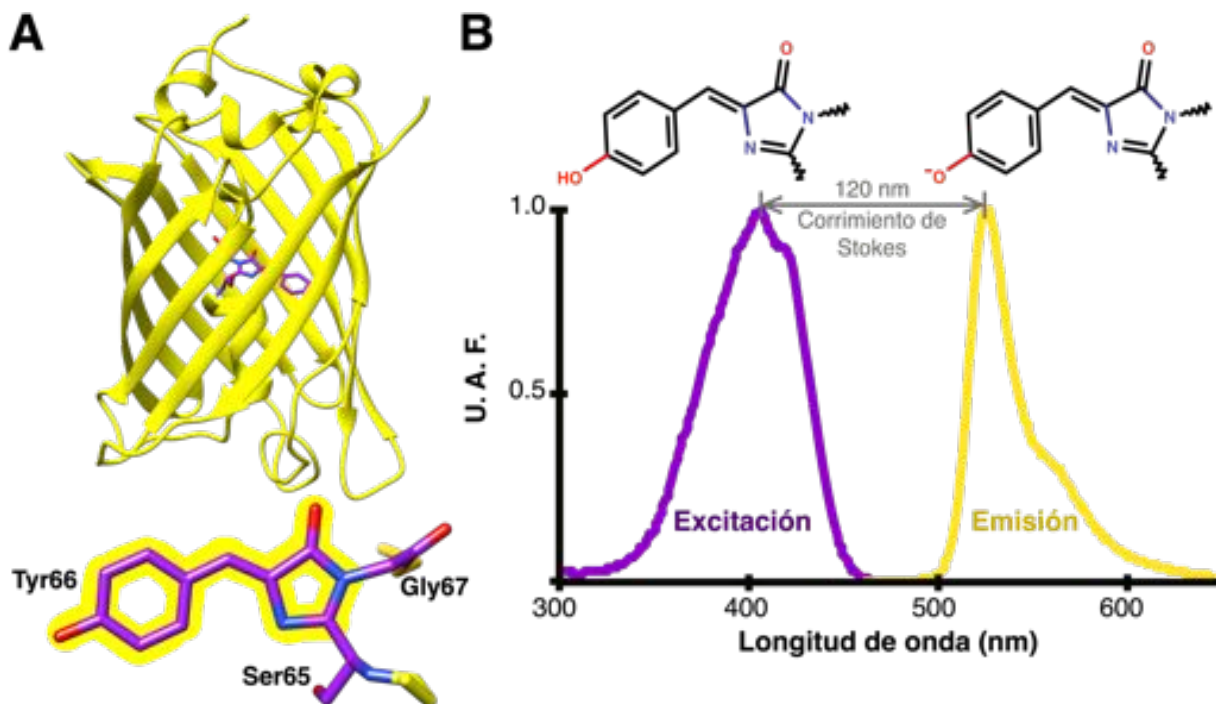


Figura 8. Estructura y espectros de fluorescencia de mAmetrine.

(A) En la parte superior se muestra un modelo de la estructura de mAmetrine con su plegamiento de barril β . En la parte inferior se muestra el fluoróforo p-HBI formado por los aminoácidos SYG. (B) Espectros de excitación (morado) y emisión (amarillo) de la proteína mAmetrine purificada con su correspondiente estado de protonación del cromóforo.

El cromóforo, tanto de mAmetrine como de la wtGFP (figura 8A, panel inferior), es una 4-(*p*-hidroxibencilideno)imidazolin-5-ona (p-HBI) que se encuentra unida al esqueleto peptídico mediante las posiciones 1 y 2 del anillo de imidazolinona (Shimomura, 1979) y es el resultado de la ciclización, oxidación y

deshidratación espontánea de los residuos S65-Y66-G67 que están en la hélice α central (Cubitt *et al.*, 1995).

Esta serie de reacciones, denominadas maduración del cromóforo (figura 9), suceden cuando la proteína está a punto de alcanzar su plegamiento nativo, ya que necesitan del reacomodo torsional del tripéptido SYG, causado por el doblamiento de casi 80° de la hélice α (Sample *et al.*, 2009). Estos ajustes relocalizan al carbono del grupo carbonilo de la S65 (C_{65}) cerca del nitrógeno del grupo amino de la G67 (N_{67}), lo que promueve el ataque nucleofílico del N_{67} al C_{65} , generando así la ciclización del péptido (Craggs, 2009).

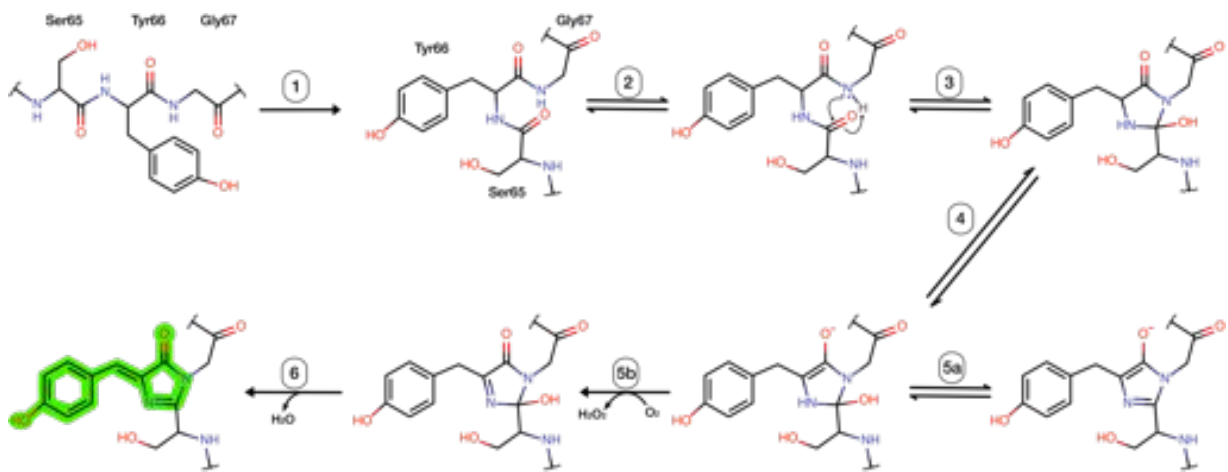


Figura 9. Maduración del cromóforo SYG de la wtGFP.

Se muestran los pasos de la maduración del cromóforo SYG. Paso 1: reacomodo torsional; 2: ataque nucleofílico; 3: ciclización; 4: enolización; 5a: equilibrio deshidratación-hidratación; 5b: oxidación; 6: deshidratación. (Modificado de Craggs, 2009)

Posteriormente, ocurre una enolización, formando un intermediario no fluorescente. Este intermediario puede ser conducido a una reacción de deshidratación o a una de oxidación (Figura 9, reacciones 5 a y b, respectivamente). En la primera, se crea un equilibrio entre intermediarios hidratados y deshidratados. En la segunda, la oxidación, es el paso limitante para la maduración del cromóforo, ya que en ambientes anaerobios no se observa fluorescencia. Después de esta reacción de oxidación, sigue una de deshidratación la cual extiende el sistema de electrones conjugados de la imidazolinona hasta el grupo fenol de la tirosina

(Craggs, 2009). Cabe mencionar que el cromóforo maduro sólo es fluorescente cuando la proteína se encuentra totalmente plegada, ya que el arreglo compacto del barril β restringe el movimiento rotacional y vibracional del cromóforo durante su estado excitado y lo protege de posibles apagadores (Seward & Bagshaw, 2009).

La wtGFP, a pH neutro, tiene dos picos de absorción, el más prominente está en 395 nm (llamado pico A) y el otro en 475 nm (pico B). Estos dos picos corresponden, respectivamente, al cromóforo en su forma neutra (el grupo de la tirosina es un fenol) y aniónica (fenolato). Al excitar a las longitudes de onda de los picos A o B independientemente se obtienen un picos de emisión en 508 nm para el primero y en 503 nm para el segundo (Tsien, 1998). El hecho de que el cromóforo neutro tenga una emisión parecida a la del cromóforo aniónico indica que se ioniza durante su estado excitado, por lo que la especie que emite el fotón es el cromóforo aniónico y no la neutra (Meech, 2009). Esto sucede porque durante el estado excitado los electrones del cromóforo se redistribuyen hacia el anillo aromático volviendo al grupo hidroxilo del fenol más ácido, lo que le permite ceder un protón (Han & Zhao, 2011). A este fenómeno se le conoce como transferencia de protones en estado excitado (ESPT, por sus siglas en inglés).

A pesar de que mAmetrine y wtGFP poseen el mismo cromóforo, sus espectros de excitación y de emisión son distintos. Esto se debe a que los aminoácidos del barril β que se encuentran cerca del cromóforo modifican su microambiente. Desafortunadamente, no se cuenta aún con la estructura cristalográfica de mAmetrine. Sin embargo, por homología con las estructuras disponibles de la GFP y sus variantes se puede deducir que el corrimiento hacia la derecha de los espectros de fluorescencia de mAmetrine se debe a una interacción π - π de apilamiento entre el fenol de la Y66 y el anillo bencénico de la F203 y que su gran corrimiento de Stokes (120 nm) es debido a que en el estado basal el cromóforo está completamente protonado (neutro) absorbiendo con un pico máximo

de 406 nm y por ESPT la especie que emite es la ionizada con un máximo de 526 nm (Ai *et al.*, 2008).

Debido a la total separación de sus espectros de excitación y de emisión, mAmetrine, se ha usado en ensayos de FRET junto con una proteína roja fluorescente llamada tdTomato (Ai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011). Esta combinación resultó ser exitosa y la única que no tiene sangrado producido por la excitación basal del aceptor. Por lo tanto, sería deseable tener un análogo fluorescente de AMPc con características espectroscópicas similares a las de tdTomato.

2. 4. Dy-547: un aceptor para mAmetrine

Uno de los fluoróforos con longitudes de onda de excitación y emisión similares a las de tdTomato es la carbocianina Dy-547 (tabla 2 y figura 10). El fluoróforo Dy-547 (figura 10A) es un derivado sulfonatado de Cy3, por lo que tiene cargas negativas que lo vuelven hidrofílico, además tiene un brillo, eficiencia cuántica y fotoestabilidad mayor a los de Cy3 (Roy *et al.*, 2008). Aunado a esto, Dy-547 tiene un coeficiente de extinción molar alto, característica esencial para fungir como buen aceptor en un par FRET. Con base en lo anterior, un análogo fluorescente de AMPc basado en Dy-547 podría ser el aceptor idóneo para el donador EPAC-mAmetrine.

Tabla 2. Propiedades espectroscópicas de tdTomato y Dy-547.

	$Ex_{\lambda_{max}}$ (nm)	$Em_{\lambda_{max}}$ (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Φ
tdTomato	554	581	138,000	0.69
Dy-547	557	574	150,000	~0.2

De hecho en la literatura ya existe un análogo fluorescente de AMPc con el fluoróforo Dy-547, el cual está unido al carbono 8 (C8) de la base nitrogenada mediante un espaciador de 2-aminoetiltilio de 4 átomos. Este fluoróforo (8-[Dy-547]-cAMP) fue sintetizado por Kusch y colaboradores para estudiar la regulación

mediada por la unión de AMPc a los CNBD del canal HCN2 (Biskup *et al.*, 2007; Kusch *et al.*, 2010, 2011) pero nunca antes se ha usado como un aceptor de FRET.

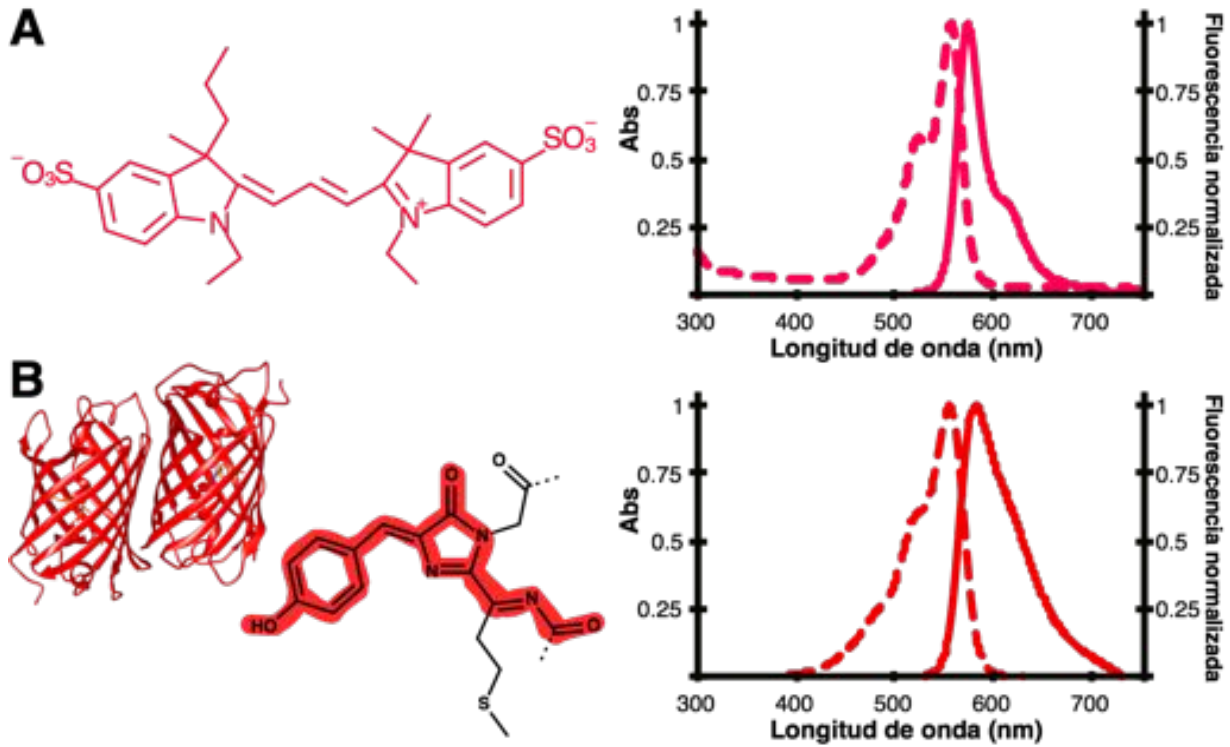


Figura 10. Estructura y espectros de Dy-547 y tdTomato.

(A) En el lado izquierdo se muestra la estructura química de Dy-547, del lado de derecho sus espectros de absorción (línea discontinua) y emisión (línea continua). (B) De izquierda a derecha, la estructura de la proteína tdTomato, su cromóforo (formado por los residuos MYG) y sus espectros de absorción (línea discontinua) y emisión (línea continua).

3. JUSTIFICACIÓN

Nuestro interés por el estudio de los CNBD radica principalmente en determinar si existe una regulación directa del sNHE por el AMPc, ya que esta proteína tiene un posible CNBD en su extremo carboxilo e interacciona con la ACs, la principal enzima productora de AMPc en el espermatozoide. Además, existe un gran número de proteínas con CNBD para las que su regulación directa por nucleótidos cíclicos no se ha determinado experimentalmente.

Para poder corroborar la unión entre un CNBD y AMPc, en el laboratorio, desarrollamos el ensayo tipo FRET EPAC-CFP/8-[Fluo]-AMPc. Dicho ensayo ofrece grandes ventajas frente a otro tipo de ensayos de unión, como un alto grado de sensibilidad, especificidad e incluso la posibilidad de realizarlo con proteína no purificada. Sin embargo la luz de excitación utilizada en el ensayo excita directamente (aunque en menor medida pero de manera significativa) al aceptor 8-[Fluo]-AMPc, lo que implica que parte de la fluorescencia del aceptor no es debida a FRET promovido por la interacción.

Es por ello que decidimos optimizar el ensayo de unión tipo FRET utilizando un donador con un corrimiento de Stokes grande, el cual nos va a permitir separar completamente el espectro de excitación del aceptor de la luz de excitación usada para el ensayo.

4. HIPÓTESIS

Utilizar como donador a mAmetrine, una proteína fluorescente con corrimiento de Stokes grande, y como aceptor al análogo fluorescente de AMPc 8-[Dy-547]-AMPc permitirá realizar un ensayo de unión mediante la técnica de FRET sin la contaminación de la fluorescencia del aceptor (Dy-547) debida a su excitación directa.

5. OBJETIVOS

5. 1. *Objetivo General*

Desarrollar un método sencillo y confiable para determinar la unión entre nucleótidos cíclicos y dominios de unión a nucleótidos cíclicos mediante la técnica de FRET intermolecular.

5. 2. *Objetivos Particulares*

1) Diseñar y establecer el ensayo de unión tipo FRET entre EPAC-Ametrine y 8-[Dy-547]-AMPc.

- a. Construir los plásmidos que codifiquen para las proteínas quiméricas conformadas por el CNBD de EPAC I y la proteína fluorescente Ametrine.
- b. Expresión y purificación de las proteínas quiméricas en *Escherichia coli*.
- c. Realizar el ensayo de unión tipo FRET con proteína purificada y distintas proporciones de donador y aceptor para confirmar nuestra hipótesis.

2) Expresar la construcción EPAC-mAmetrine en la superficie de células eucariotas para explorar la posibilidad de establecer una nueva metodología de cribado de alto rendimiento (“high throughput-screening”) para dominios de unión a nucleótidos cíclicos.

- a. Clonar EPAC-Ametrine en el vector pDisplay, el cual tiene un péptido señal que permitiría a la proteína quimérica estar anclada a la membrana y expuesta hacia el lado extracelular.
- b. Confirmar la expresión de la proteína en la superficie celular.
- c. Realizar el ensayo de unión en la superficie celular.

6. MÉTODOS

La composición de las soluciones, medios y mezclas de reacción, así como las secuencias de los oligonucleótidos y los mapas de los plásmidos se encuentran en la sección de información suplementaria.

6. 1. *Preparación de células quimiocompetentes*

Se utilizó el método mejorado de preparación de células quimiocompetentes con CaCl_2 que reportaron Li y colaboradores (Li *et al.*, 2010). Este método consiste en picar una sola colonia de *E. coli* para inocular 5 mL de medio LB líquido; este preinóculo se deja crecer a 37 °C toda la noche (12 a 14 h), con una agitación moderada (220–250 rpm).

Posteriormente se toman 2 mL del cultivo para inocular 200 mL de LB líquido, y se incuba en agitación moderada a 37 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) alcance un valor entre 0.4 y 0.45. Cuando el cultivo alcanza dicha densidad óptica, se divide en 4 alícuotas en tubos Falcon (BD) estériles de 50 mL y se deja reposar durante 5 min en hielo.

Los siguientes pasos se tienen que realizar en hielo o a 4 °C, con las soluciones previamente enfriadas y cuidando de no calentar la muestra durante el manejo de la misma. Se centrifuga a 1,000 g durante 5 min a una temperatura constante de 4 °C, al terminar la centrifugación se decanta y se resuspende el paquete celular (“pellet”) en 20 mL de la solución de CaCl_2 descrita en la sección de materiales. Se deja reposar los tubos en hielo durante 5 min y se repite el proceso de centrifugación, decantamiento y resuspensión. Se centrifugan nuevamente a 1,000 g durante 5 min a una temperatura constante de 4 °C.

Finalmente, se resuspende el pellet con 4 mL de la solución de CaCl_2 para células competentes y se preparan alícuotas de 100 μL en tubos Eppendorf de 600 μL . Las alícuotas se guardan a -70 °C.

6. 2. Transformación de células quimiocompetentes

Para amplificar los plásmidos se toma una alícuota de células competentes (100 μ L), se le agregan entre 30 ng y 100 ng del plásmido de interés (o 10 μ L de la reacción de ligación) y se coloca en hielo 20 min. Posteriormente, se da el choque térmico a 42 °C durante 2 min y se vuelve a colocar en hielo durante 5 min. Se le añaden 400 μ L de medio LB sin antibiótico y se deja en agitación moderada a una temperatura constante de 37 °C durante una hora. Para terminar, se siembran entre 50 μ L y 100 μ L en placas de LB sólido suplementado con antibiótico y se incuba a 37 °C toda la noche.

6. 3. Purificación de plásmido por lisis alcalina (miniprep)

Se inocula una colonia de bacterias previamente transformadas con el plásmido de interés en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina. El cultivo se deja toda la noche (14–16 h) a temperatura y agitación constante (37 °C, 250 rpm).

A la mañana siguiente, se centrifuga el inóculo en una microcentrífuga durante 5 min a 4,000 g. Se descarta el sobrenadante y se realiza el protocolo rápido de GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific) como se dicta a continuación. Se resuspende la pastilla celular (“pellet”) en 250 μ L de la solución de resuspensión hasta obtener una mezcla homogénea. Se añaden 250 μ L de la solución de lisis y se mezcla cuidadosamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces (hasta que la solución se vuelva viscosa e incolora).

Inmediatamente después, se añaden 350 μ L de la solución de neutralización y se mezcla por inversión. La muestra se centrifuga a 12,000 g durante 5 min para eliminar los restos celulares y se trasfiere el sobrenadante a una columna del kit. Se centrifuga un minuto a 12,000 g y se descarta la solución que pasa a través de la columna. Se hacen dos lavados con 500 μ L de solución de lavado (etanol al 70% v/v) y se centrifuga a 12,000 g. Es de extrema importancia realizar una centrifugación adicional para eliminar el etanol residual presente en la solución de lavado.

Para resuspender el plásmido, se coloca en la columna 50 μ L de agua mili-Q a 50 °C, dejándola incubar durante 2 min. Se coloca la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se centrifuga a 12,000 g durante 2 min. La muestra se almacena a -20 °C.

6. 4. PCR

En este trabajo se utilizaron las DNA polimerasas Vent (NEB) y Phusion (Thermo Scientific). La primera se usó para obtener DNA de doble cadena de un tamaño menor a 1,500 pares de bases (pb), mientras que la segunda se utilizó para productos de mayor tamaño y para las mutaciones sitio dirigidas. Se utilizaron los protocolos recomendados por el fabricante. La composición de las mezclas de reacción, así como las condiciones empleadas se encuentran en la sección de información suplementaria. Todas las reacciones se prepararon en hielo en tubos de polipropileno de pared delgada especiales para PCR de 200 μ L.

6. 5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se prepara una solución con 1 % de agarosa con amortiguador TAE. Se calienta la mezcla 45 s en el microondas a máxima potencia, se agita con precaución hasta que la agarosa está completamente disuelta y se deja enfriar hasta que alcance una temperatura entre 50 °C–55 °C. Se agrega bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, stock 10 mg/mL) para llegar a una concentración final de 0.5 μ g/mL y se vierte en el dispositivo previamente armado para que gelifique.

Ya gelificado, se retiran los peines que dan lugar a los pozos y el gel se coloca dentro de la cámara de electroforesis, la cual se llena con amortiguador TAE. En los pozos se cargan entre 6 a 10 μ L de la muestra (disuelta en amortiguador de carga para gel de agarosa) y la electroforesis se realiza aplicando un potencial eléctrico constante de 80 V. Como el gel se encuentra preteñido con bromuro de etidio, se puede observar la separación de las bandas si se excita con luz UV o azul.

6. 6. Aislamiento de DNA a partir de un gel de agarosa

Se corta la banda de interés del gel de agarosa y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se añaden 3 volúmenes del amortiguador QG (solución tomada del kit de Qiagen QIAquick) por volumen de gel y se incuba a 55 °C durante 10 min o hasta que el gel se encuentre completamente disuelto.

Ya disuelto se añaden 10 µL de acetato de sodio 3 M para mantener el pH. Se añade un volumen de isopropanol y se coloca la muestra en una columna del kit GeneJET, se centrifuga a 12,000 g durante un min. Se descarta la solución del tubo colector, se agregan 750 µL de solución de lavado del kit GeneJET a la columna y la muestra se centrifuga nuevamente durante un min. Se realiza una centrifugación adicional para remover completamente la solución de lavado.

Para eluir el plásmido se coloca la columna dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregan 50 µL de H₂O mili-Q. Se incuba durante dos min a 60 °C y finalmente se centrifuga a 12,000 g durante 2 min para obtener el fragmento ya purificado de DNA.

6. 7. Digestión con enzimas de restricción

Todas las reacciones se realizaron a 37 °C durante ~4 h y con un volumen final de 50 µL o 100 µL, utilizando los amortiguadores sugeridos por el fabricante (ver información suplementaria). Como sustrato se utilizaron entre 600 y 1000 ng de DNA para aislar los fragmentos para su posterior ligación y para corroborar las ligaciones por patrón de restricción se usó entre 100 – 300 ng.

6. 8. Purificación de DNA en columna de sílica

Se utiliza el kit DNA clean & concentrator™ -5 (Zymo) de la siguiente manera: Se agregan 5 volúmenes del amortiguador de unión por un volumen de reacción, se mezcla vigorosamente en el vórtex y se transfiere la muestra a una columna del kit.

Se centrifuga durante 30 s a 13,000 g y se descarta la solución del tubo colector. Se añaden 200 µL de amortiguador de lavado, se centrifuga durante 30 s y

se descarta la solución del tubo colector, el paso de lavado se repite una vez más. Se agregan directamente a la columna 15 μL de agua a una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ y se transfiere la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se centrifuga durante 30 s más para obtener la muestra purificada y concentrada.

6. 9. Ligación de fragmentos de DNA

La reacción de ligación de extremos cohesivos entre el vector y el inserto se realiza con una proporción de 1:5, utilizando aproximadamente 30 fmoles de vector (~75 ng) en un volumen final de 30 μL . Se incuba a 16 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche (12-14 h). Posteriormente, se transforman células de *E. coli* competentes de la cepa JM109(DE3) o DH5 α según sea el caso con 10 o 15 μL de la reacción.

6. 10. Mutagénesis sitio dirigida

Se usa una estrategia similar a la del kit QuickChange (Stratagene), pero utilizando la DNA polimerasa Phusion y células competentes caseras de las cepas JM109(DE3). El diseño de los oligonucleótidos difiere en que son sólo parcialmente complementarios, es decir, los oligonucleótidos sólo hibridan entre ellos en la parte 5', esto con el fin de evitar la dimerización entre los oligonucleótidos a temperaturas elevadas (Zheng *et al.*, 2004). Es importante que las bases que se desean mutar se coloquen a la mitad de la parte complementaria de los oligonucleótidos.

Para mutar los plásmidos se realizan las PCR con la enzima Phusion usando como templado plásmido metilado (purificado de cepas de *E. coli* con genotipo *Dam*⁺ *Dcm*⁺) y los oligonucleótidos diseñados para cada mutación; como control se realiza una reacción con la misma cantidad de templado pero sin DNA polimerasa. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación y se purifica el DNA mediante columna de sílica (también el del control).

El DNA obtenido se digiere con la enzima de restricción DpnI para eliminar el plásmido que usamos de templado y que no porta la mutación. Se vuelve a purificar

por columna y se transforman células competentes de *E. coli* con el control y con el DNA mutado y al siguiente día se comparan las placas.

Si en la placa del control no crecieron colonias o hay por lo menos 3 veces menos que en la placa del plásmido mutado se pican colonias al azar de este último y se pone un inóculo de cada una en 3 mL de LB con antibiótico. Los inóculos se dejan en agitación a 37 °C durante una noche y a la mañana siguiente se realiza el Miniprep de cada uno para mandar a secuenciar el plásmido y así corroborar si la mutagénesis fue exitosa o no.

6. 11. Selección de colonias positivas

Si se transformó la cepa JM109(DE3) con plásmidos que contengan el promotor T7, un sitio de unión a ribosoma (RBS) y alguna proteína fluorescente, se puede seleccionar la colonia dependiendo del espectro de fluorescencia de la proteína fluorescente en cuestión. Para ello se seleccionan de dos a cinco colonias fluorescentes para inocularlas por separado en 3 mL de LB líquido, y paralelamente se estrían las posibles candidatas en una caja Petri con medio LB sólido suplementado con antibiótico. El inóculo se incuba toda la noche a 37 °C con agitación moderada. Al día siguiente se adquiere el espectro de emisión de cada inóculo y así se corrobora si pertenece a la construcción deseada.

6. 12. Expresión de proteína

Se transforman bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) o JM109(DE3) con la construcción de interés según el protocolo descrito anteriormente. Por recomendación del Dr. Takeharu Nagai, se inocula una sola colonia en 100 mL de LB líquido suplementado con antibiótico y sin IPTG. Se deja crecer el cultivo en agitación moderada durante 4 días a 20 °C, finalizado este tiempo se deja incubado a 4 °C en agitación durante 1 o 2 horas. Posteriormente, el cultivo se traslada a dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifuga a 2,500 g durante 20 min a una temperatura

constante de 4 °C. Se decanta el sobrenadante y la pastilla con las células se puede almacenar a -20 °C.

6. 13. Purificación de proteína

Todos los pasos se tienen que realizar en hielo o a 4 °C, con las soluciones previamente enfriadas y cuidando de no calentar la muestra durante el manejo de la misma. La pastilla formada por la previa centrifugación del cultivo se resuspende con 2 mL de solución de lavado. Se centrifuga a 2,500 g durante 20 min a una temperatura constante de 4 °C y el paso de centrifugación y lavado se repite tres veces, en el último lavado se resuspenden las células con la solución para sonicación y se agregan 40 µL del coctel de inhibidor de proteasas cOmplete (Roche).

La muestra se divide a la mitad en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se rompen las células con 3 pulsos de sonicación a 20 kHz con una potencia acústica entre 20 – 35 W y con una duración de 50 s (dejando 1 min de descanso entre cada uno), cuidando de no hacer espuma. Se centrifuga la muestra a 20,000 g durante 30 min, a una temperatura constante de 4 °C. Se recupera el sobrenadante (proteína soluble) en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se coloca en hielo o a 4 °C.

6. 13. 1. Cromatografía de afinidad a Ni²⁺

Se prepara la columna de purificación con 1 mL de Ni-NTA Superflow (Qiagen); cuando la resina con níquel se encuentre bien empaquetada se equilibra con 5 mL de la solución S1. Se añade la proteína soluble y posteriormente 3 mL de solución S1, después se lava la proteína inespecífica con 4 mL de solución S2 y se eluye con 3 mL de la solución S3 de tal forma que se produzcan fracciones de aproximadamente 200 µL.

6. 13. 2. Diálisis

Para quitar el NaCl y el imidazol de las proteínas purificadas se dializaron en un amortiguador de Tris HCl 10 mM con una membrana de celulosa (Pierce Thermo Scientific) con un tamaño molecular de corte de 10 kDa (10K MWCO) y 16 mm de diámetro. Se cortan ~8 cm de membrana seca para cada muestra. Las membranas se lavan con agua destilada y EDTA, calentándolas hasta que hierva, se hace un segundo lavado pero sólo con agua destilada y se deja hervir.

Posteriormente se enjuagan en agua tetradestilada sin calentar. Se hace un nudo firme en uno de los extremos y se coloca la muestra (~1 mL) a dializar, se hace un segundo nudo dejando un poco de espacio entre éste y la muestra para que pueda flotar y no se rompa por la presión osmótica.

La membrana con la muestra se coloca en un recipiente con amortiguador de diálisis en un volumen 1000 veces mayor al de la muestra y se deja en agitación durante tres horas a 4 °C; el amortiguador se cambia por lo menos 5 veces. En el último cambio, la muestra se puede dejar toda la noche en agitación y a 4 °C. A la mañana siguiente se recupera la muestra y se guarda a 4 °C.

6. 14. Cuantificación de proteína

6. 14. 1. Espectrofotometría de absorción en el rango de luz visible

Utilizando una celda de cuarzo con una longitud de paso óptico (b) de 1 cm, el valor del pico de absorbancia (A) en el rango de luz visible y los coeficientes de extinción molar (ϵ) reportados (tabla 3) se determinan las concentraciones (c) de los fluoróforos mediante la ley de Beer-Lambert descrita en la siguiente ecuación.

$$A = \epsilon bc \quad (10)$$

Tabla 3. Características reportadas de los fluoróforos utilizados en este trabajo.

	Abs _{λ_{\max}} (nm)	Em _{λ_{\max}} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ	Brillo ^A (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
mECFP*	451 (435)	475 (496)	32,500	0.37	12
mAmetrine**	406	526	45,000 35,000	0.58	26 20
mAmetrine 1.2	408	525	31,000	0.6	19
8-[Fluo]-AMPc	492	508	79,000	0.8	63
8-[Dy-547]-AMPc	553	564	150,000	~0.2	30

* Todas las variantes de CFP tienen dos picos de absorción y de emisión, entre paréntesis se muestra la λ segundo pico.

** Están reportados dos valores de ϵ para mAmetrine por el mismo laboratorio que la creó (Ai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011).

^A Es el producto de ϵ por Φ .

6. 14. 2. Método de Lowry

La cuantificación se realiza empleando el kit RCDC protein Assay (BioRad). En tubos Eppendorf de 1.5 mL se pipetea 25 μ L de muestra. Se agregan 125 μ L de reactivo I, se mezcla con el vórtex y se deja incubando un min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se agregan 125 μ L de reactivo II, se mezcla vigorosamente con el vórtex y se centrifuga la muestra a 15,000 g durante 5 min. Se descarta el sobrenadante por inversión.

Al pellet formado se le agregan 127 μ L de reactivo A', se incuba durante un periodo de 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se mezcla utilizando un vórtex y se añade un mL de reactivo B. Se incuba durante 15 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

6. 15. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepara un gel de poliacrilamida al 10 % de 0.75 mm de grosor con el peine y vidrios pertinentes del sistema de electroforesis mini-protean de BioRad. Las muestras se preparan con 3 μ g de proteína y el buffer de cargado, se hierven durante 10 minutos. Cuando los geles están totalmente polimerizados se cargan con la muestra preparada y la electroforesis se realiza aplicando un potencial eléctrico de 100 V durante aproximadamente una hora.

Los geles se tiñen dejándolos 30 minutos en la solución de Coomassie. Posteriormente se cambia el gel a una solución para desteñir y se deja incubando 30 minutos, se vuelve a cambiar la solución para desteñir hasta lograr apreciar correctamente las bandas.

6. 16. Dicroísmo circular

Para tomar los espectros de dicroísmo circular (CD) en el rango de UV lejano es necesario utilizar muestras dializadas en Tris HCl 10 mM y diluirlas a una concentración de 0.3 mg/mL. Los datos de los espectros se adquieren cada 1 nm desde 190 nm a 260 nm con un tiempo de adquisición de 2 s por punto en un espectropolarímetro Jasco J-715 (JASCO Analytical Instruments) utilizando una celda de cuarzo con un paso óptico de 0.1 cm y 300 μ L de muestra.

6. 17. Adquisición de los espectros de fluorescencia

Los datos de los espectros de fluorescencia de los fluoróforos (100 nM) se adquieren cada 1 nm con un tiempo de adquisición de 0.4 s por punto en un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000 con una lámpara de xenón UXL 450S-O (Ushio, Japón) utilizando una celda de cuarzo de 1 mL. Para adquirir los espectros de fluorescencia de mAmetrine, EPAC-mAmetrine, EPAC-mAmetrine1.2 y EPAC_{R279E}⁻ mAmetrine 1.2 se utilizan longitudes de onda muy cercanas de los picos, es decir para obtener el espectro de excitación se fija en 525 nm la longitud de onda de emisión y para obtener sus espectros de emisión se fija en 406 nm la longitud de onda de excitación.

Para obtener los espectros excitación de EPAC-CFP, 8-[Fluo]-AMPc y 8-[Dy-547]-AMPc se fija en 485 nm, 515 nm y 585 nm la longitud de onda de emisión, respectivamente. Y para los espectros de emisión se fija la luz de excitación en 425 nm, 480 nm y 525 nm. Adicionalmente se toman los espectros de emisión de los fluoróforos utilizando la longitud de onda de excitación del ensayo de unión, es decir

440 nm para EPAC-CFP/8-[Fluo]-AMPc y 406 nm para EPAC-Ametrine/8-[Dy-547]-AMPc.

6. 18. Ensayo de unión en solución y por espectrofluorimetría

El ensayo de unión tipo FRET se realiza en celdillas de cuarzo (45 μ L) o de poliestireno (2 mL) para fluorimetría (Sigma), utilizando distintas proporciones de donador:aceptor (1:2, 1:5, 1:10), siendo siempre la concentración de donador 50 nM. Para cada ensayo se toman los espectros de emisión individuales del buffer, donador, acepto, donador en presencia del acepto (condición de FRET) y por último, el espectro del donador, más acepto y competidor (condición sin FRET). Como competidor se utiliza al análogo no fluorescente de AMPc 8-CPT-AMPc (BioLog) a una concentración 100 veces mayor que la del acepto. Para los ensayos de unión con construcciones de CFP se utiliza una luz de excitación de 440 nm y con las de mAmetrine 406 nm.

6. 19. Cultivo celular

Se mantienen en cultivo células de ovario de hámster chino (CHO) en cajas Petri de 35 mm de diámetro y con 3 mL del medio ADMEM suplementado dentro de una incubadora VWR Scientific 2100 a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se resiembran cada 48 h de acuerdo al siguiente protocolo.

Se aspira el medio de cultivo; las células pegadas se lavan con 3 mL de PBS (Gibco, Invitrogen); se retira el PBS mediante succión; se despegan las células con 1 mL de tripsina (TryPLE™ Express, Gibco, Life Technologies), se dejan incubando a 37 °C durante 1 min y se comprueba que se hayan despegado mediante observación con un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS 100. En el caso de que no se encuentren en suspensión se dan ligeros golpes con el dedo índice a la caja y se dejan incubando no más de 2 min en total.

La reacción de la tripsina se bloquea con medio ADMEM suplementado; se resuspenden las células 30 veces con una pipeta. Si el pase se hizo sólo para

mantener la línea, se toman 200 μL de la suspensión, se colocan en una caja Petri nueva de 35 mm, se mezcla cuidadosamente y se meten las cajas a la incubadora.

En el caso de que el pase se haya realizado para la posterior transfección de las células se toman 125 μL de la suspensión y se coloca esa cantidad en cada pozo de las cajas Petri de 35 mm de diámetro con separaciones (4 pozos) y fondo de vidrio (In vitro Scientific). Para terminar se agregan 500 μL de DMEM suplementado, se agita sutilmente la caja sobre la mesa y se dejan en la incubadora.

6. 20. Transfección de células CHO

La transfección se realiza ~24 h después del pase cuando las células están en una confluencia de aproximadamente 60 % (~800 células/ mm^2). Primero, se prepara en un tubo estéril de poliestireno una solución que contenga 100 μL de ADMEM sin suero, 6 μL del reactivo PLUS™ (Gibco, Life Technologies) y 1 μg del plásmido a transfectar; se mezcla cuidadosamente y se deja incubando 15 minutos. Después del tiempo de incubación se le agregan 7 μL de lipofectamina (Invitrogen) y se deja incubando la mezcla durante 15 minutos más.

Mientras tanto se succiona el medio de las cajas que contienen las células a transfectar, se lavan con 500 μL de PBS sin suero y se vuelve a aspirar el medio. Rápidamente se agregan 900 μL de ADMEM sin suero al tubo con la mezcla de plásmido-lipofectamina y de ahí se toman 250 μL para cada pozo de una caja Petri. Se incuban las cajas a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 5 h.

Pasado este tiempo se aspira el medio y se agrega 1 mL de medio ADMEM sin suero a cada pozo, se vuelve a aspirar el medio y se agregan 500 μL de ADMEM suplementado (suero + antibióticos). Las células transfectadas se dejan incubando a 37 °C, 5 % CO_2 durante 48 h para poder usarlas.

6. 21. Ensayo de unión con microscopía FLIM

Las mediciones del tiempo de vida media de la fluorescencia (τ) se realizan en el sistema de microscopía Marianas de disco giratorio Yokogawa CSU-W1 con módulo de FLIM (Intelligent imaging innovations, 3i). Este sistema cuenta con un microscopio invertido Zeiss acoplado a una cámara ICCD Pi-Max®4-1024i-RF (Princeton instruments), la cual es capaz de medir el tiempo de vida media en el dominio de frecuencia.

Se utiliza un objetivo Zeiss plan apocromático para aceite de inmersión con una magnificación de 63x y una apertura numérica de 1.4. Para obtener una luz de excitación modulada se usa un láser de diodo de 405 nm y de 445 nm para los ensayos con mAmetrine y CFP, respectivamente. Se emplean filtros pasabanda de emisión FF01-525/30 para mAmetrine y 482/35 para CFP.

La calibración del equipo se hace con HPTS, el cual es un compuesto fluorescente con un τ estable y caracterizado ($\tau= 5.4$ ns). Todas las imágenes adquiridas se analizan con el programa Slide Book Digital Microscopy Software.

Los ensayos se realizan en solución y con las células transfectadas de la siguiente manera: Se mide la τ del donador (τ_D) en las siguientes condiciones: donador, donador en presencia del aceptor (condición de FRET) y donador + aceptor + competidor (para estos experimentos usamos AMPc a una concentración 1,000 veces mayor que la del aceptor; esta es una condición donde no hay FRET, ya que el AMPc desplaza a los análogos fluorescentes del sitio de unión).

6. 21. 1. Con proteína purificada

Para los ensayos en solución se preparan 100 μ L de las muestras para cada condición a distintas proporciones de donador:aceptor (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) en tubos independientes. Se coloca una gota de 30 μ L de la muestra en el centro de un cubreobjetos, el cual se sitúa sobre el objetivo con aceite de inmersión.

6. 21. 2. En células de cultivo que expresan las proteínas en su superficie.

En el caso del ensayo de unión en células transfectadas primero se aspira el medio en el que se encuentran para colocar 500 μL de medio de registro en cada pozo (PBS, pH ~ 7.6). Se toma la imagen en esta condición (*i. e.* sólo donador). Después se quitan 100 μL del medio y en su lugar se ponen 100 μL de una solución de PBS con el aceptor a una concentración de 20 μM y se mezcla cuidadosamente para que quede una concentración final de 4 μM de aceptor, se toma la imagen en esta condición (*i. e.* donador + aceptor, condición con FRET). Para tomar la imagen con el competidor (condición sin FRET) se succionan 100 μL del pozo que se sustituyen con 100 μL de una solución de PBS con aceptor (20 μM) y con competidor (AMPc 20 mM).

6. 22. Ensayos de apagamiento (“quenching”) por Cu^{2+}

El apagamiento de la fluorescencia de las FPs con Cu^{2+} se realizó en solución con proteínas purificadas y con las células transfectadas. Para el primero se midió en el espectrofluorómetro el cambio en la intensidad de fluorescencia en presencia y ausencia de Cu^{2+} . Para el ensayo en células transfectadas se midió el decremento en la τ del donador. Se utilizó CuSO_4 a una concentración final de 8 mM u 800 μM .

7. RESULTADOS

7. 1. Desarrollo del ensayo de unión entre EPAC-Ametrine y 8-[Dy-547]-AMPc

Hasta el momento existen reportadas dos variantes de la proteína mAmetrine, la primera versión está denominada como mAmetrine (Ai *et al.*, 2008) y la segunda mAmetrine 1.2 (Ding *et al.*, 2011). La primera es ligeramente más brillante que la segunda debido a que su coeficiente de extinción molar es más alto (ver tabla 3). Sin embargo, la variante mAmetrine 1.2 es menos proclive al fotoblanqueo y su eficiencia cuántica es mayor que la de su predecesora. Aunque el uso de mAmetrine 1.2 parecía más prometedor, decidimos usar ambas variantes para comprobarlo.

7. 1. 1. Preparación de los plásmidos que codifican para las quimeras EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2

Utilizamos los plásmidos mAmetrine-pRSETb (preparado por M. en C. Yoloxóchitl Sánchez-Guevara) y pBAD-mAmetrine 1.2 (Addgene #42171) para construir las proteínas quiméricas formadas por el CNBD de EPAC I unido al extremo amino de las proteínas fluorescentes mAmetrine y mAmetrine 1.2 (desde ahora me referiré a las construcciones como EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2 respectivamente). Para el diseño de las construcciones (ver figura suplementaria 1 y 2) se utilizó como base al plásmido EPAC-CFP-pRSETb (los mapas de todos los plásmidos usados en este trabajo se encuentran en la información suplementaria). Este plásmido es derivado del vector pRSETb (Invitrogen), en el cual, bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y un sitio de unión a ribosoma (RBS), está la secuencia que codifica para la proteína quimérica compuesta por una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino (6H), el CNBD de la proteína EPAC I de humano y CFP en el carboxilo; el origen de replicación del plásmido es derivado de pUC, por lo que es un plásmido de alto número de copias (500-700 copias/célula) (Lin-Chao *et al.*, 1992). La secuencia que codifica a CFP se encuentra flanqueada

por los sitios de restricción BamHI y HindIII, por lo que diseñamos oligonucleótidos específicos (la lista de los oligonucleótidos y sus secuencias se encuentra en la información suplementaria) para amplificar y añadir los sitios de restricción mediante PCR al extremo 5' y 3' de los genes de mAmetrine y mAmetrine 1.2 (figura 11).

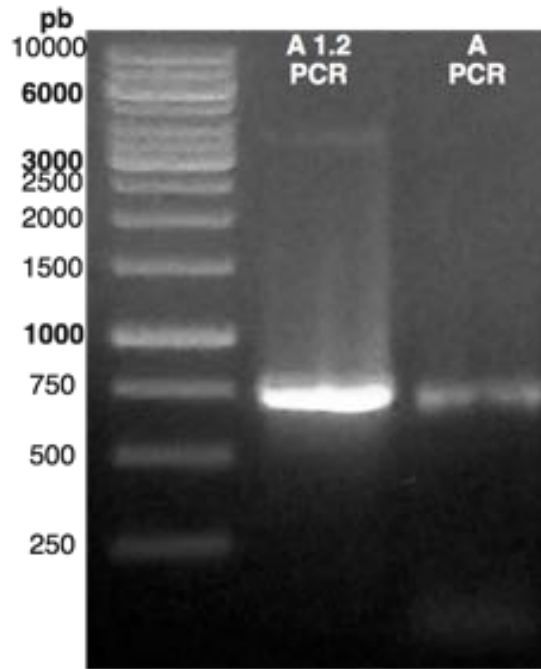


Figura 11. Inserción de los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III mediante PCR.

Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR de mAmetrine (A) y mAmetrine1.2,(A1.2) obtenidos con los oligonucleótidos Tak 178F y Tak 90R, los cuales añaden en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción BamHI y HindIII respectivamente. Al igual que los genes de la mayoría de las proteínas fluorescentes, su secuencia es de aproximadamente 750 pb.

Una vez purificados los productos de PCR, realizamos la reacción de digestión con las enzimas BamHI y HindIII. Paralelamente digerimos con las mismas enzimas el plásmido EPAC-CFP-pRSET y aislamos la banda de ~3,300 pb correspondiente al vector lineal más el CNBD de EPAC I (figura 12). Se realizó la ligación de los extremos pegajosos del vector y mAmetrine, se transformó la cepa de *E. coli* JM109(DE3) con el plásmido circularizado y realizamos el mismo procedimiento con mAmetrine 1.2.

Para seleccionar las colonias positivas tomamos ventaja del uso de las proteínas fluorescentes (ya que cada una tiene un espectro de emisión particular)

que se producen gracias a la expresión basal del gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (RNAP-T7). Este gen se encuentra en el cromosoma bacteriano de las cepas (DE3) y su transcripción está regulada mediante el represor *lac*, que evita su transcripción masiva en ausencia del inductor, aunque permite un nivel basal de transcripción. Aún una baja expresión de la RNAP-T7 permite la transcripción específica desde el promotor T7, por lo que se expresan también de manera constitutiva los genes que se encuentren bajo este promotor (Studier & Moffatt, 1986). Como nosotros estamos usando un plásmido de alto número de copias con los genes de interés bajo el promotor T7, se produce la suficiente cantidad de proteína quimérica en ausencia de inductor, por lo que las colonias de las placas son fluorescentes.

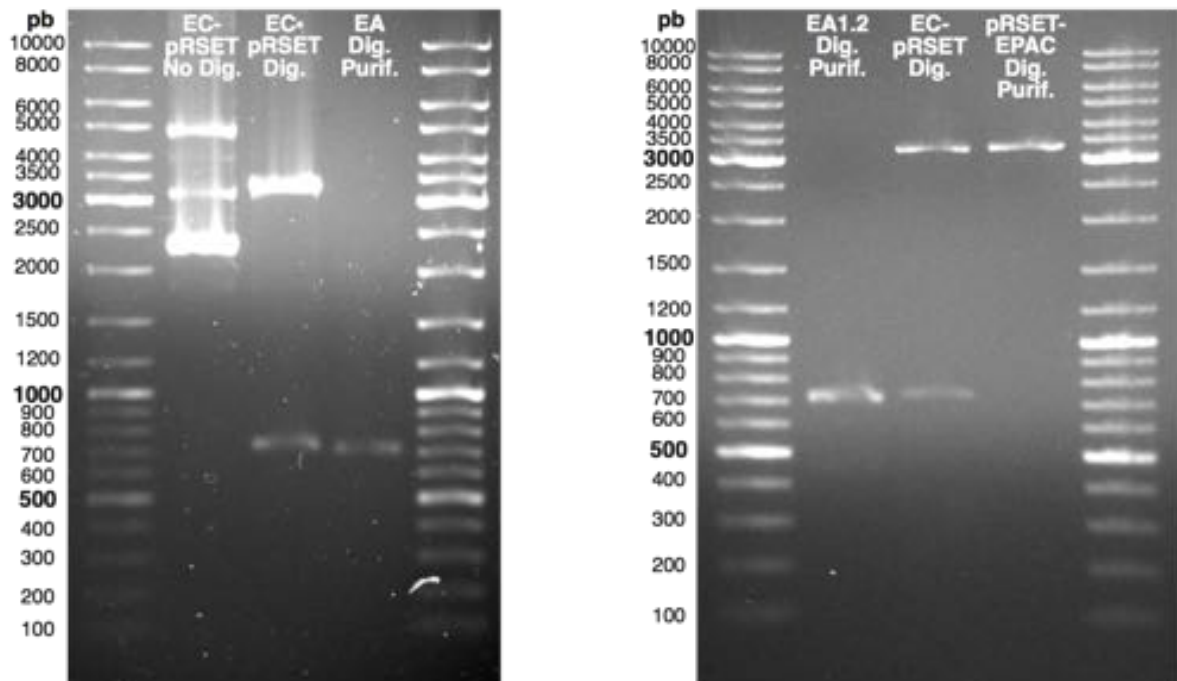


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido EPAC-CFP-pRSET y de los productos de PCR EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2 digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.

En el panel de la izquierda se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.75% del plásmido EPAC-CFP-pRSET sin digerir (EC-pRSET No Dig.), digerido (EC-pRSET Dig.) y el fragmento EPAC-mAmetrine digerido y purificado de gel de agarosa (~750 pb; EA Dig. Purif.). En el panel de la derecha se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% de EPAC-mAmetrine1.2 digerido y purificado (~750 pb; EA1.2 Dig. Purif.), el plásmido EPAC-CFP-pRSET digerido y la banda que corresponde al vector pRSET más el CNBD de EPAC aislado (3,300pb; pRSET-EPAC Dig. Purif.).

Con base en lo anterior, picamos 5 colonias al azar de cada construcción e inoculamos por separado 3 mL de LB líquido suplementado con antibiótico. A la mañana siguiente, adquirimos el espectro de emisión de cada cultivo para poder diferenciar entre las colonias negativas (EPAC-CFP) y las que poseyeran las construcciones con mAmetrine y mAmetrine 1.2 (figura 13). Obtuvimos entre el 70 y 80 % de colonias positivas según su espectro de emisión, de ahí elegimos a dos de los cultivos de cada construcción para extraer el DNA plasmídico y mandarlo secuenciar para garantizar completamente que fuera la construcción correcta.

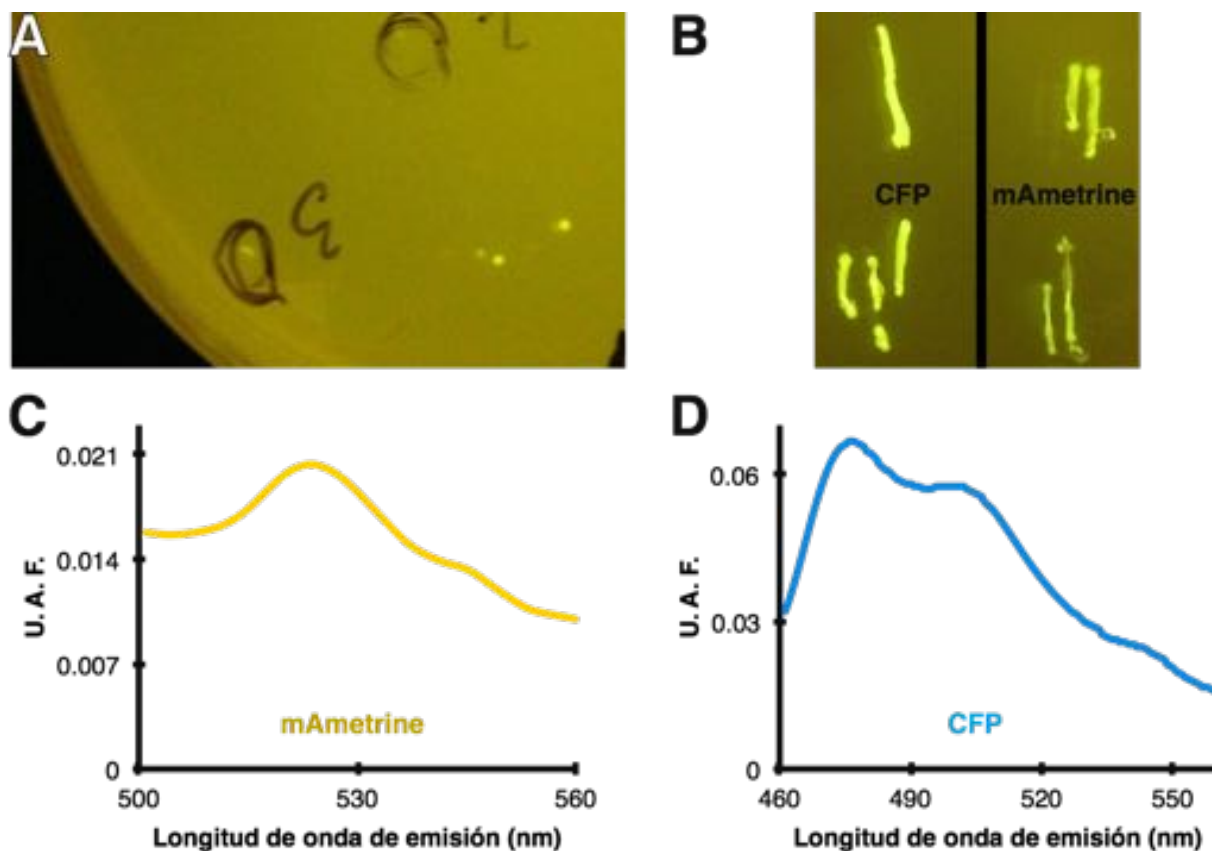


Figura 13. Selección de colonias positivas mediante fluorescencia.

En el panel A se muestran las colonias fluorescentes de *E. coli* JM109(DE3) transformadas con la reacción de ligación, podemos ver su fluorescencia debido a que están siendo irradiadas sobre un transiluminador DarkReader™ que emite en un rango de 400 a 500 nm. El panel B muestra colonias de EPAC-CFP y EPAC-mAmetrine reestriadas en una caja Petri con LB sólido, es difícil discernir a simple vista entre colonias que expresan EPAC-CFP y EPAC-mAmetrine. Los paneles C y D corresponden a los espectros de emisión de los cultivos inoculados. (U. A. F. = unidades arbitrarias de fluorescencia).

7. 1. 2. Expresión de las proteínas quiméricas

Se transformaron las células de las cepas de expresión BL21(DE3) o JM109(DE3) de *E. coli* con los plásmidos de las construcciones EPAC-mAmetrine, EPAC-mAmetrine 1.2 y EPAC-CFP, este último se utilizó como control ya que esta proteína quimérica ya ha sido expresada y cuantificada con éxito en el laboratorio. La expresión de las tres proteínas se logró con éxito, ya que tanto el cultivo líquido como las pastillas formadas después de su centrifugación eran fluorescentes (figura 14).

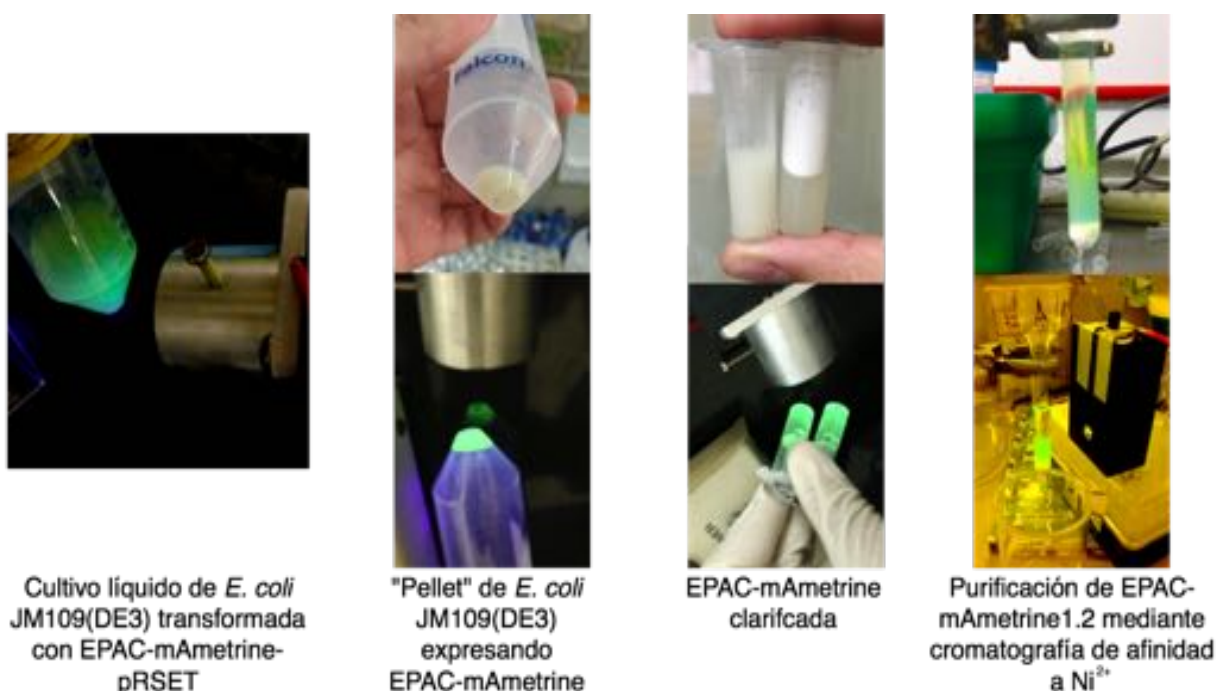


Figura 14. Seguimiento de la expresión y purificación de las proteínas quiméricas mediante fluorescencia.

Se muestran fotografías de los diferentes pasos de la purificación de las proteínas quiméricas EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2. Las imágenes inferiores muestran la fluorescencia de las quimeras, como fuente de iluminación se utilizaron LEDs, las primeras tres fotografías fueron iluminadas con uno UV de 405 nm y la última con el LED "Royal Blue" (emite en un rango de 400 – 500 nm, con un máximo en 445 nm).

La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad a Ni²⁺, ya que las proteínas quiméricas poseen una cola de seis histidinas (6H) en su extremo amino. Al igual que en la expresión, en el proceso de purificación se pudo observar la fluorescencia de las quimeras (figura 14). Para validar la cuantificación de

proteína mediante la espectrofotometría de absorción en el rango de luz visible utilizando el máximo de absorción de las proteínas fluorescentes, también determinamos la concentración de las proteínas quiméricas mediante el método de Lowry (figura 15).

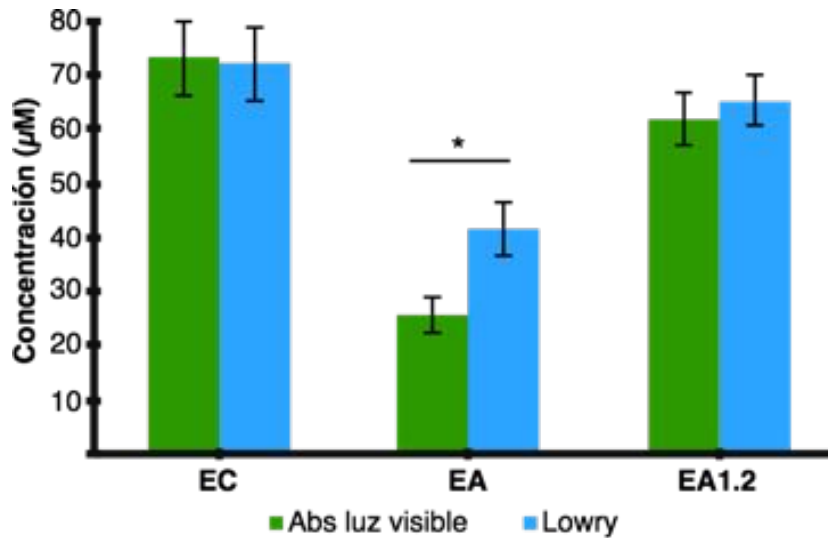


Figura 15. Comparación de los métodos utilizados para medir la concentración de las proteínas quiméricas.

Se muestran las concentraciones promedio con sus desviaciones estándar de distintos lotes de proteínas purificadas ($n \geq 4$; prueba t de Student, $*P < 0.05$).

Observamos que para las proteínas EPAC-CFP y EPAC-mAmetrine 1.2 no había diferencia significativa entre la concentración obtenida por ambos métodos. Sin embargo, para EPAC-mAmetrine la discrepancia entre los valores obtenidos fue significativa, posiblemente debido a una maduración incompleta del fluoróforo.

Para evaluar la calidad de las proteínas purificadas realizamos una electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (figura 16), donde se observa una única banda del peso molecular esperado de las tres proteínas (~47 kDa) en los carriles correspondientes a la fracción purificada.

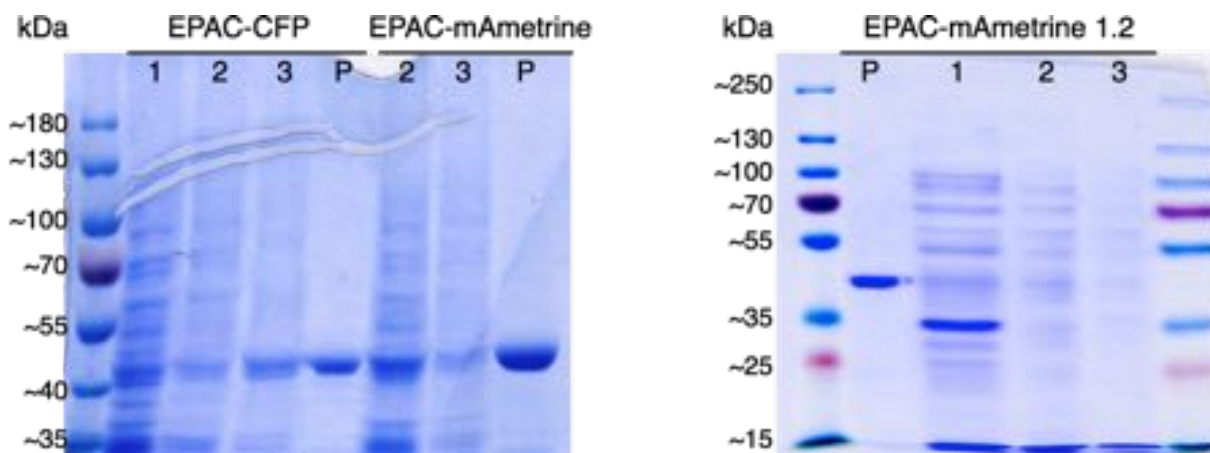


Figura 16. Geles de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de las proteínas quiméricas EPAC-CFP, EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2.

En el gel de la izquierda se muestra la expresión en la cepa BL21(DE3) de EPAC-CFP y EPAC-mAmetrine, mientras que el de la derecha corresponde a la expresión y purificación de EPAC-mAmetrine1.2 en la cepa JM109(DE3). Los carriles con el número 1 corresponden a la proteína que no se pegó a la columna, el 2 a la proteína que se despegó con la solución alta en sales (S1, 300 mM NaCl), el 3 a la proteína que se lavó con la solución con baja concentración de imidazol (S2, 50 mM de imidazol) y P a la proteína purificada eluída con 250 mM de imidazol.

7. 1. 3. Determinación de los espectros de fluorescencia

Una vez purificadas, caracterizamos los espectros de fluorescencia de las proteínas quiméricas EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine 1.2 (figura 17) y del análogo fluorescente 8-[Dy-547]-AMPC (figura 18). Los espectros de la quimera EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPC ya habían sido caracterizados en el laboratorio y se muestran en la figura suplementaria 3.

Los espectros de fluorescencia de las proteínas mAmetrine y sus derivados son muy característicos ya que no siguen la regla de la imagen especular, la cual indica que el espectro de emisión es la imagen especular del espectro de excitación. La regla de la imagen de espejo se explica por la casi idéntica separación entre los niveles vibracionales del S0 y el S1 (porque sus geometrías son muy parecidas) en moléculas rígidas. Esto no sucede para mAmetrine y sus variantes debido a que cuando el cromóforo absorbe se encuentra protonado (su cromóforo es neutro), pero al emitir se ioniza, por lo que se trata de dos especies diferentes cada una con sus geometría de S0 y S1.

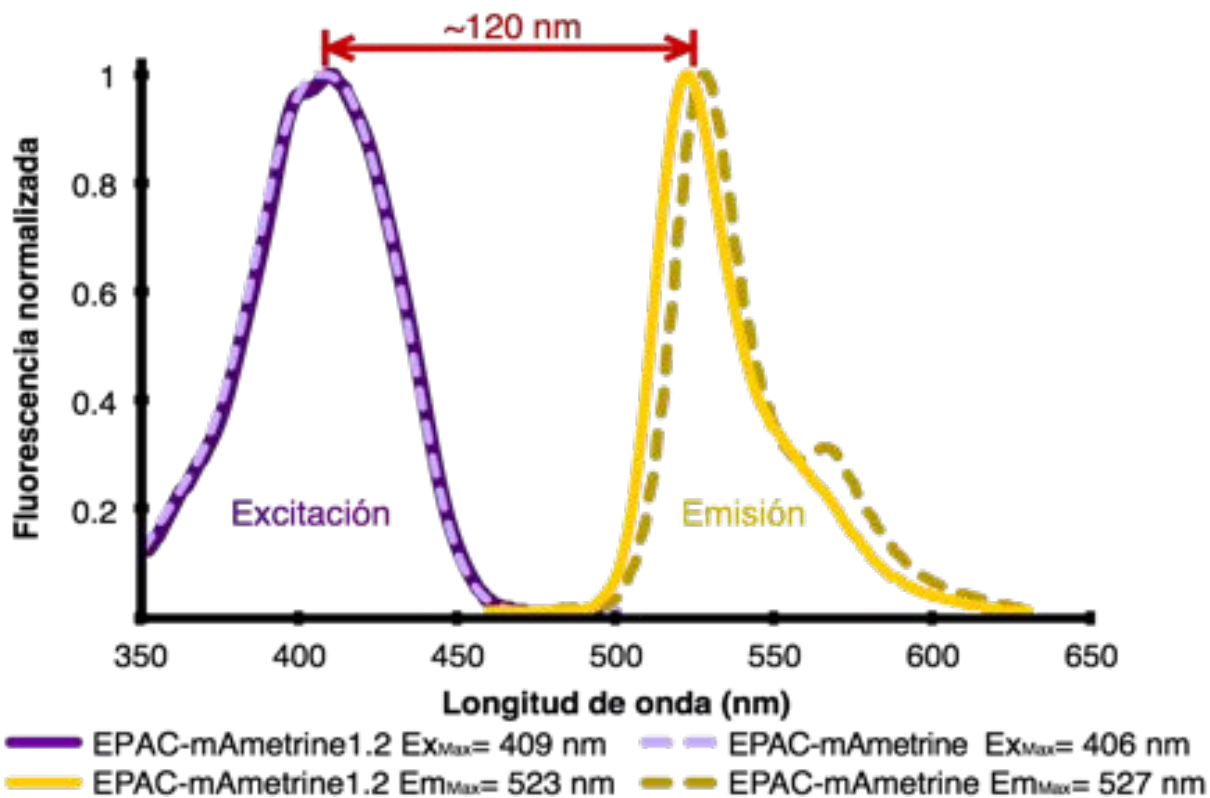


Figura 17. Espectros de fluorescencia de EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2

Se muestran los espectros de excitación (morado) y emisión (amarillo) de las proteínas quiméricas EPAC-mAmetrine (líneas discontinuas) y EPAC-mAmetrine1.2 (líneas sólidas). La gráfica representa claramente el gran corrimiento de Stokes que poseen estas proteínas fluorescentes, ya que sus picos están separados 121 y 114 nm, respectivamente.

Comparando los espectros de las quimeras con los reportados para mAmetrine y mAmetrine 1.2, observamos que el pico de excitación de EPAC-mAmetrine coincidió con el reportado (406 nm), pero su pico de emisión se recorrió 1 nm hacia la derecha (de 526 nm a 527 nm). En el caso de mAmetrine 1.2, el pico de excitación se recorrió 1 nm hacia la derecha (de 408 nm a 409 nm), mientras que el de emisión lo hizo 2 nm hacia la izquierda (de 525 nm a 523 nm). En ambos casos, el corrimiento de Stokes fue mayor a 100 nm (figura 17).

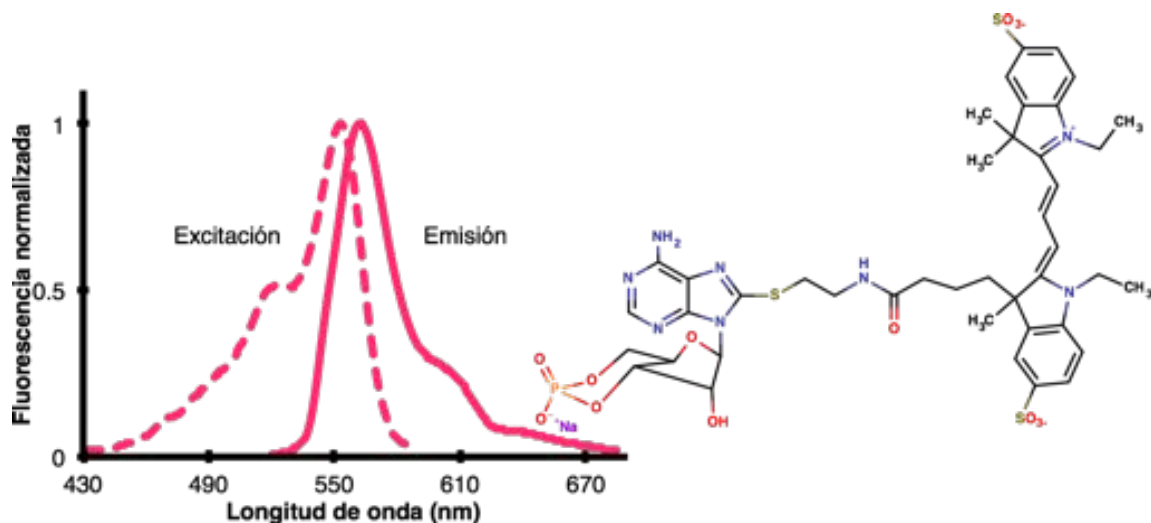


Figura 18. Espectros de fluorescencia y estructura de 8-[Dy-547]-AMPc

Este análogo fluorescente de AMPc está unido al carbono 8 (C8) de la base nitrogenada mediante un espaciador de 2-aminoetilto de 4 átomos y tiene un pico de excitación de 553 nm y un pico máximo de emisión de 562 nm.

Se eligió a 8-[Dy-547]-AMPc como aceptor (figura 18) de Ametrine debido a que su espectro de absorción se sobrepone con el espectro de emisión de mAmetrine y mAmetrine 1.2 y no absorbe a 406 nm (figura 19), que es la longitud de onda utilizada para excitar al donador durante los ensayos de unión. Además se ha utilizado para activar los canales HCN, lo que indica que la adición del fluoróforo no perjudica de manera drástica su interacción con el dominio (Kusch *et al.*, 2010, 2011).

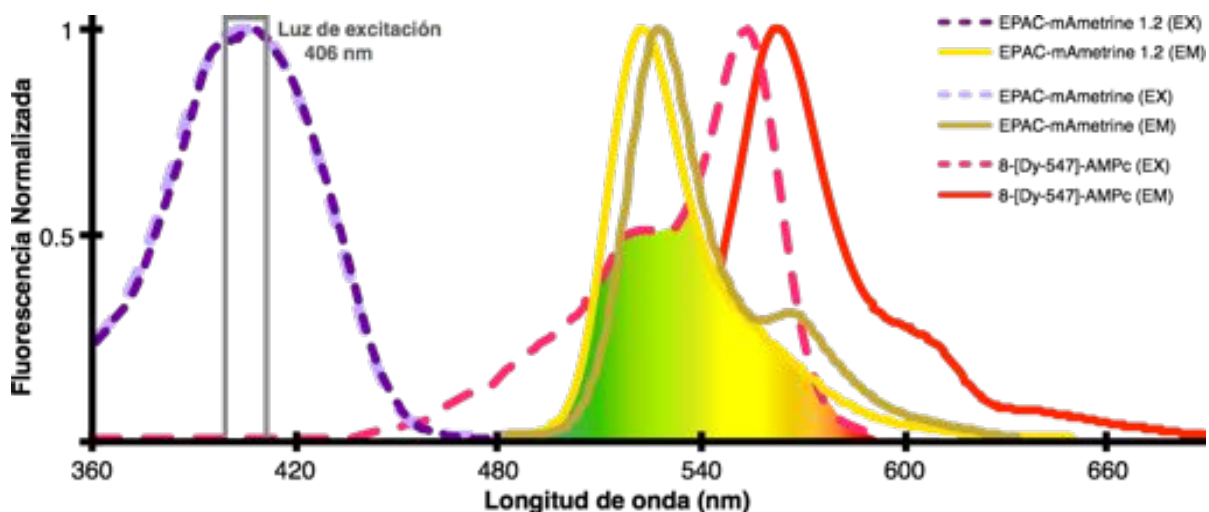


Figura 19. Sobreposición de los espectros de emisión del donador con el de excitación del aceptor. Se muestran los espectros de absorción (línea discontinua) y emisión (línea sólida) de EPAC-mAmetrine, EPAC-mAmetrine.1.2 y 8-[Dy-547]-AMPc. El recuadro gris indica la luz de excitación utilizada durante los ensayos de unión y el área coloreada representa la sobreposición del espectro de emisión del donador EPAC-mAmetrine1.2 con el espectro de excitación del aceptor 8-[Dy-547]-AMPc.

Para asegurarnos que 8-[Dy-547]-AMPc no presentaba una emisión basal al ser excitado a 406 nm, adquirimos su espectro de emisión utilizando una luz de excitación de 406 nm y el resultado fue el esperado: 8-[Dy-547]-AMPc no se excita a 406 nm y por lo tanto no emitirá fluorescencia si no hay FRET durante el ensayo de unión (Figura 20).

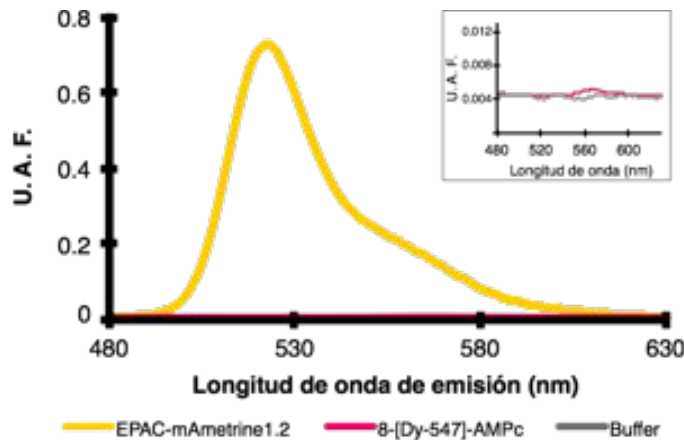


Figura 20. Espectros de emisión de EPAC-mAmetrine1.2 y 8-[Dy-547]-AMPc excitados a 406 nm.

Se muestran los espectros de emisión de 1 μ M de EPAC-mAmetrine1.2 y 1 μ M 8-[Dy-547]-AMPc adquiridos en las mismas condiciones con una luz de excitación de 406 nm. En el recuadro se muestra un acercamiento del espectro de emisión del análogo fluorescente de AMPc comparado con la señal del buffer. (U. A. F. = unidades arbitrarias de fluorescencia).

7. 1. 4. Ensayo de unión tipo FRET en solución

Partiendo de lo anterior, realizamos los ensayos de unión con tres distintas proporciones de donador y aceptor (1:2, 1:5 y 1:10) utilizando como donador a EPAC-mAmetrine y a EPAC-mAmetrine 1.2 y como aceptor a 8-[Dy-547]-AMPc; la luz de excitación fue de 406 nm y la concentración de donador fue 50 nM. Adicionalmente, realizamos experimentos similares pero con EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPc como control utilizando una luz de excitación de 440 nm, ya que estos ya habían sido realizados en el laboratorio y calculamos la eficiencia de FRET para los tres pares a distintas proporciones (tabla 4).

Tabla 4. Eficiencia de FRET a distintas proporciones de donador : aceptor

	1 : 2	1 : 5	1 : 10
EPAC-mAmetrine : 8-[Dy-547]-AMPc	0.19 \pm 0.04	0.28 \pm 0.04	0.32 \pm 0.03
EPAC-mAmetrine1.2 : 8-[Dy-547]-AMPc	0.31 \pm 0.04	0.46 \pm 0.06	0.51 \pm 0.04
EPAC-CFP : 8-[Fluo]-AMPc	0.71 \pm 0.04	0.78 \pm 0.06	0.81 \pm 0.05

Los datos se presentan como el promedio \pm su desviación estándar.

En la figura 21 se observa que en todos los ensayos la fluorescencia del donador se reduce en presencia del aceptor, esto quiere decir que está ocurriendo FRET entre los fluoróforos y por ende el análogo fluorescente de AMPc se está uniendo al CNBD de EPAC I. Para comprobar lo anterior se realizó un ensayo de competencia con 8-CPT-AMPc a una concentración 100 veces mayor a la del aceptor, esta molécula es un análogo no fluorescente de AMPc con una afinidad 65 veces mayor (Christensen *et al.*, 2003). Como era de esperarse, la fluorescencia del donador se recuperó ya que el 8-CPT-AMPc desplazó a 8-[Dy-547]-AMPc del sitio de unión.

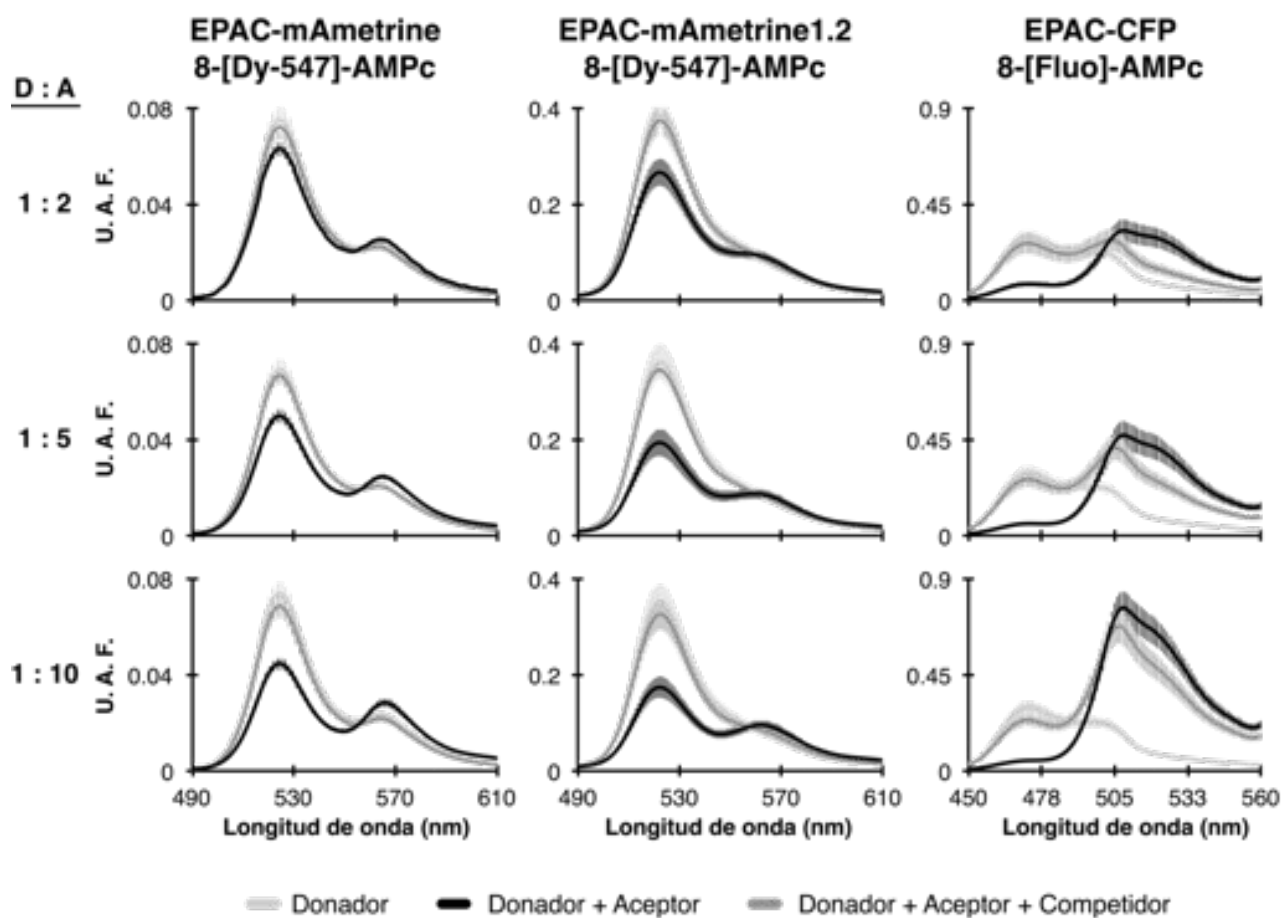


Figura 21. Ensayo de unión a distintas proporciones de donador y aceptor.

Se muestran los trazos promedios ($n=3$) con sus respectivas desviaciones estándar de los ensayos de unión que se realizaron con una longitud de onda de excitación de 406 nm para los pares FRET con Ametrine y 440 nm para CFP. Cada columna pertenece a un par y cada fila muestra una proporción donador:aceptor distinta (1:2, 1:5, 1:10). La concentración de donador fue 50 nM en todos los ensayos. Como competidor se utilizó 8-CPT-AMPc a una concentración 100 veces mayor a la del aceptor. (U. A. F.=Unidades arbitrarias de fluorescencia).

Es importante hacer notar que en el ensayo de unión con EPAC-CFP/8-[Fluo]-AMPc la forma del espectro de emisión en presencia de competidor cambia dependiendo de la proporción de donador:aceptor utilizada (figura 22). Esto se debe a que 8-[Fluo]-AMPc se excita con la luz de la lámpara y emite sin que haya interacción entre el análogo de AMPc y el CNBD. En cambio, para el par mAmetrine/8-[Dy-547]-AMPc y mAmetrine 1.2/8-[Dy-547]-AMPc esto no sucede, por lo que estos fluoróforos podrían ser utilizados en experimentos donde es difícil poder controlar la proporción de donador:aceptor.

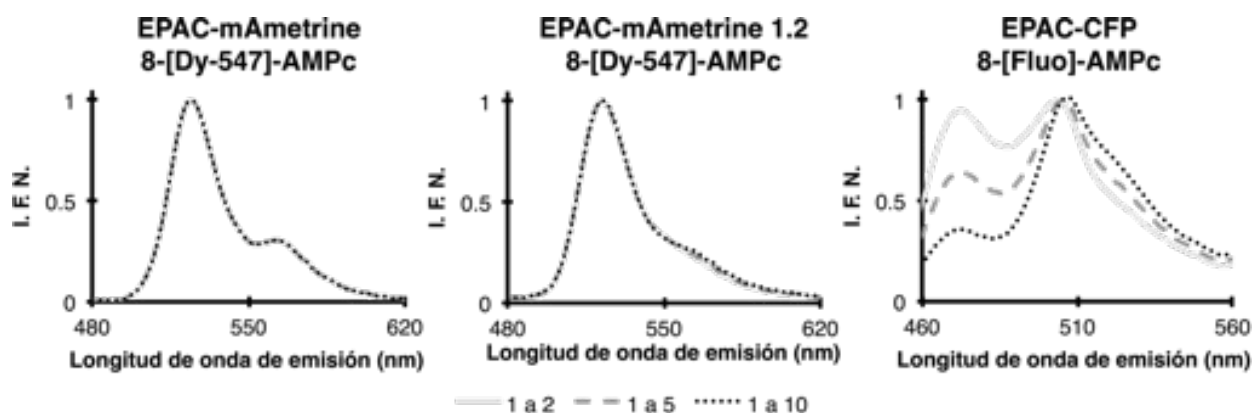


Figura 22. Comparación de los espectros de emisión en presencia de competidor.

Se muestran los espectros normalizados de los ensayos de unión en presencia de competidor, podemos observar que en el caso del par FRET con EPAC-CFP la forma del espectro cambia dependiendo de la cantidad de aceptor utilizada, esto se debe a la excitación directa que recibe el aceptor.

Adicionalmente, preparamos una construcción con EPAC-mAmetrine 1.2 donde mutamos específicamente la arginina del PBC por un ácido glutámico (R279E, la numeración corresponde a la posición del residuo en la secuencia de la proteína EPAC I completa), a esta construcción la denominamos EPAC_{R279E}-mAmetrine 1.2 (figura 23 y suplementaria 4).

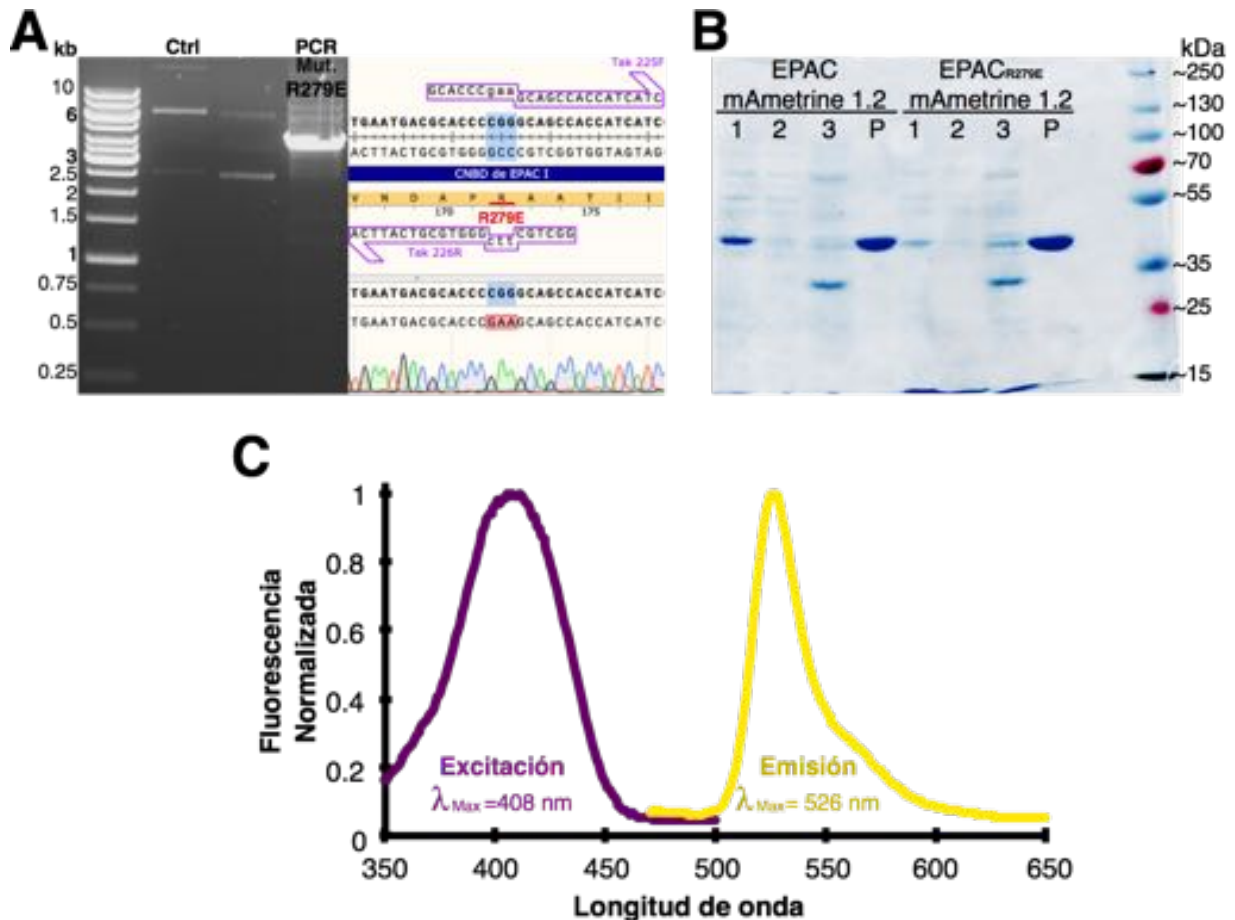


Figura 23. Preparación de la mutante EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2

El panel A del lado izquierdo muestra el gel de agarosa de la electroforesis del producto de la PCR con los cebadores Tak225F y Tak226R que contiene la mutación del codón CGG que codifica para la arginina del PBC por GAA que codifica para ácido glutámico (R279E) y en el carril control se muestra la reacción de PCR pero sin enzima. Del lado derecho arriba se muestra los cebadores alineados con la secuencia de nucleótidos del plásmido silvestre (EPAC-mAmetrine1.2-pRSET) y en la parte de abajo el cromatograma de la secuenciación del plásmido mutante alineado con la secuencia del silvestre. El panel B muestra el gel de SDS-PAGE de la purificación de la proteína silvestre y mutante, los carriles con el número 1 corresponden a la proteína que no se pegó a la columna, el 2 a la proteína que se despegó con la solución alta en sales (S1, 300 mM NaCl), el 3 a la proteína que se lavó con la solución con baja concentración de imidazol (S2, 50 mM de imidazol) y P a la proteína purificada. El panel C muestra los espectros de fluorescencia de la mutante con sus respectivos máximos de excitación y emisión.

Como era de esperarse, al realizar el ensayo de unión con la mutante no hubo transferencia de energía, es decir la fluorescencia del donador no disminuyó en presencia del aceptor (figura 24).

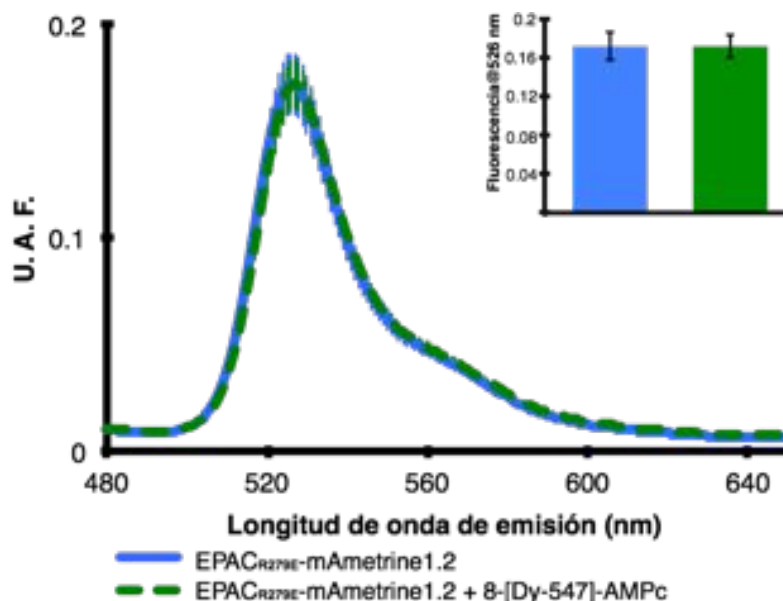


Figura 24. La mutación R279E evita la unión entre el CNBD y el análogo de AMPc.

Se muestra el ensayo de unión utilizando 100 nM de donador y 1 μ M de aceptor y una luz de excitación de 406 nm. En el inset se muestra la intensidad media de fluorescencia a 525 nm (pico del donador) con sus desviaciones estándar del donador (azul) y donador más aceptor (verde, condición donde habría FRET).

Para cerciorarnos de que la ausencia de FRET se debiera efectivamente a la mutación y no a un mal plegamiento de la proteína, realizamos un análisis de estabilidad en el servidor de PoPMuSiC (Prediction of Protein Mutation Stability Changes, <https://soft.dezyme.com/query/create/pop>). Esta herramienta predice el cambio en la energía libre de plegamiento de la proteína antes y después de la mutación ($\Delta\Delta G$ en kcal/mol), por lo tanto un valor menor a cero correspondería a una mutación predicha como estabilizante (Dehouck *et al.*, 2009, 2011; Gonnelli *et al.*, 2012). El valor arrojado por el programa para la mutación R279E fue de 1.52 kcal/mol, por lo que la mutación fue considerada como desestabilizante. Teniendo en cuenta lo anterior, adquirimos el espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de la mutante para asegurarnos de su plegamiento correcto (figura 25).

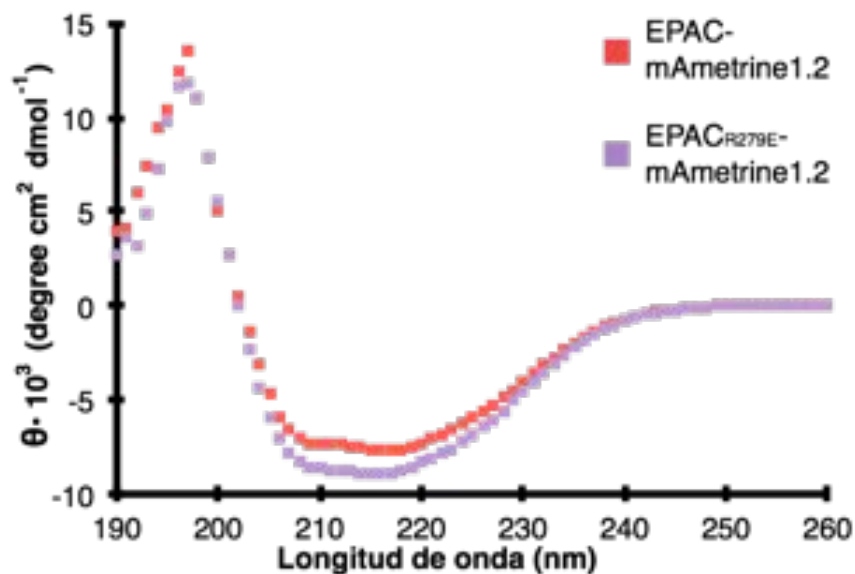


Figura 25. Evaluación de la estructura secundaria por dicroísmo circular.

Se muestran los espectros de dicroísmo circular en UV lejano de las proteínas purificadas y dialisadas en un amortiguador Tris HCl 10 mM.

Al comparar los espectros de la silvestre y la mutante podemos observar que su forma se mantiene, lo que sugiere un plegamiento correcto ya que se conserva la estructura secundaria. Adicionalmente, realizamos un análisis de deconvolución a los espectros de dicroísmo circular en el servidor CAPITO (CD Analysis & Plotting Tool, <http://capito.nmr.leibniz-fli.de>), el cual nos permitió conocer el porcentaje del tipo de estructura secundaria presente en nuestras quimeras (Wiedemann *et al.*, 2013) y así asegurarnos de que las diferencias en la magnitud de la señal de elipticidad molar no son debidos a un cambio en la estructura secundaria de la mutante (tabla 5).

Tabla 5. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular en el servidor CAPITO

	Hélices α	Hojas y giros β	Asas al azar	Total
EPAC-mAmetrine 1.2	0.11	0.42	0.46	0.99
EPAC _{R279E} -mAmetrine 1.2	0.11	0.42	0.44	0.97

7. 1. 5. Ensayo de unión midiendo el tiempo de vida media del donador (τ_D)

Otra manera de medir la transferencia de energía es cuantificando la reducción del tiempo de vida media de fluorescencia del donador (τ_D). El tiempo de vida media (τ) de la fluorescencia es el tiempo medio que un fluoróforo excitado (después de absorber el fotón) tarda en regresar a su estado basal. Cada fluoróforo tiene un τ particular, valor que puede cambiar dependiendo del medio en que se encuentre (relajación del solvente) y de la interacción con otras moléculas (apagamiento, “quenching”, dinámico de la fluorescencia).

Medimos el tiempo de vida media del donador (τ_D), del donador en presencia del aceptor (τ_{DA}) y la del donador en presencia del aceptor y competidor (τ_{DA+C}), para 4 proporciones de donador:aceptor (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) con los pares FRET EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc y EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc en un set de microscopía de tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) de dominio de frecuencia con la proteína purificada tal como está descrito en la sección de métodos.

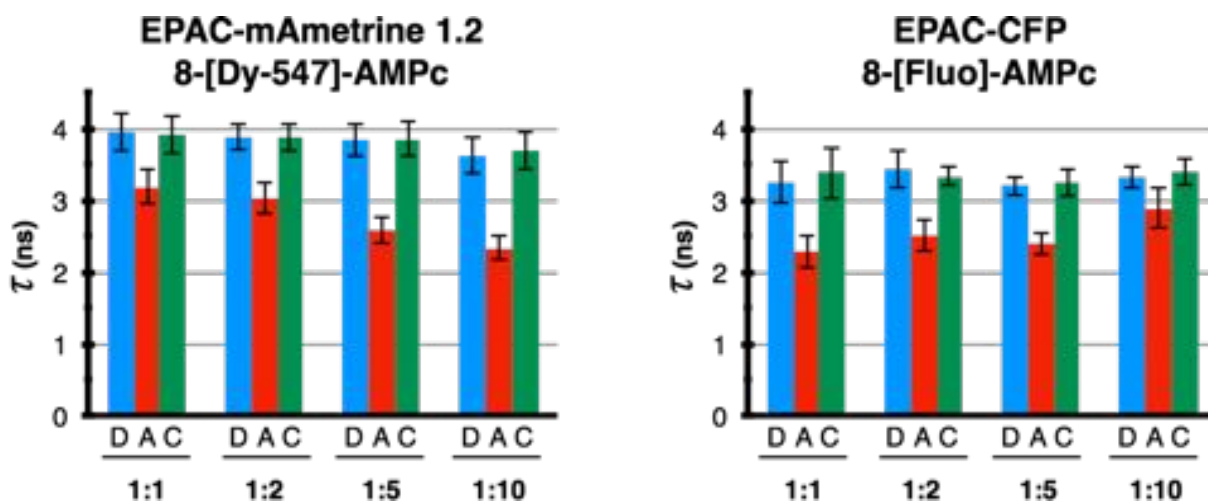


Figura 26. Ensayo de unión midiendo la τ del donador.

Se muestra la media con sus desviaciones estándar del tiempo de vida del donador (D) en presencia del aceptor (A) y el ensayo de competencia (C) de cada par FRET.

Los datos obtenidos se presentan en la figura 26 y los valores de la eficiencia de FRET aparente se encuentran en la tabla 6. Es importante mencionar que determinamos por primera vez el tiempo de vida media de fluorescencia de mAmetrine 1.2, el cual fue de 3.81 ± 0.19 ns.

Como se puede observar, los valores de eficiencia de FRET aumentan conforme se incrementa la proporción del aceptor para el par FRET con EPAC-mAmetrine 1.2, lo cual es consistente con los datos obtenidos por espectrometría. Sin embargo para EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc no sucede lo mismo, esto se debe a la excitación directa del aceptor por el láser de 445 nm que se usó para el ensayo y el uso de un filtro de emisión no adecuado, ya que hubo contaminación de la fluorescencia del aceptor. En un intento de evitar dicho sangrado, usamos el láser de 405 nm (el mismo que se usó para los ensayos con mAmetrine1.2), pero el cociente señal/ruido de EPAC-CFP se reducía demasiado y seguía habiendo señal de 8-[Fluo]-AMPc (datos no mostrados).

Tabla 6. Valores de eficiencia de FRET aparente obtenidos por FLIM

	1 : 1	1 : 2	1 : 5	1 : 10
EPAC-mAmetrine1.2 : 8-[Dy-547]-AMPc	0.19±0.04	0.22±0.06	0.33±0.03	0.36±0.04
EPAC-CFP : 8-[Fluo]-AMPc	0.29±0.08	0.27±0.04	0.25±0.06	0.13±0.06

Con los resultados hasta ahora presentados, concluimos que el uso de una proteína fluorescente con un corrimiento de Stokes grande como donador en un par FRET es una opción sencilla para evitar el sangrado de emisión basal del aceptor y viendo los inconvenientes que implica el uso de la primera versión de mAmetrine decidimos usar solamente a mAmetrine 1.2 para los experimentos posteriores que consistieron en expresar la construcción EPAC-mAmetrine 1.2 en células de mamífero con un péptido señal que le permita estar anclada en la membrana y expuesta hacia el lado extracelular para explorar la posibilidad de establecer una

nueva metodología de tamizaje de alto rendimiento (“high throughput-screening”) para dominios de unión a nucleótidos cíclicos.

Adicionalmente, se desarrolló un método que nos permite seleccionar de manera rápida y eficiente plásmidos del tipo CNBD-mAmetrine 1.2 para caracterizar nuevos dominios mediante el ensayo de unión tipo FRET, la descripción de este método se encuentra como apéndice de la tesis.

7. 2. Expresión de EPAC-mAmetrine 1.2 en la superficie de células eucariotas

Para explorar la posibilidad de utilizar este ensayo de unión como un método de “high throughput-screening” (tamizaje de alto rendimiento), podríamos omitir el paso de purificación si realizamos el ensayo directamente en la célula. Lamentablemente, el análogo fluorescente 8-[Dy-547]-AMPc tiene cargas negativas en la parte del colorante y el fosfato que lo vuelven un compuesto no permeable. Por lo anterior, ideamos una construcción que permitiera expresar a la quimera en la superficie de la célula.

En la literatura están reportados varios métodos de expresión de proteínas en la superficie celular, tanto en sistemas procariontas como eucariotas (Chen & Georgiou, 2002; Mao *et al.*, 2006; van Bloois *et al.*, 2011; Horlick *et al.*, 2013), por lo que consideramos realizar unas pruebas piloto de expresión en la superficie celular. Hasta ahora sólo habíamos expresado construcciones del tipo CNBD-FP en *E. coli*, pero por comunicación personal con el M. en C. Francisco Romero decidimos cambiarnos a un sistema eucariota, ya que él había tenido problemas durante la expresión y purificación del CNBD del sNHE en *E. coli* debido a un mal plegamiento de la proteína y había observado ciertas mejoras con un sistema de expresión heteróloga en células eucariotas.

Tomando en cuenta lo anterior, elegimos un sistema de expresión en células de mamífero utilizando el vector pDisplay, el cual es un vector comercial (Invitrogen,

Life Technologies) que permite el despliegue de las proteínas en la superficie de la membrana celular mediante la fusión en su extremo carboxilo con el dominio transmembranal de la proteína derivada de plaquetas que funciona como receptor del factor de crecimiento (PDGFR).

7. 2. 1. Construcción de los plásmidos EPAC-mAmetrine 1.2-pDisplay y EPAC_{R279E}-mAmetrine 1.2-pDisplay

Utilizamos como base el plásmido CFP-pDisplay (Addgene #20861), para intercambiar la secuencia de CFP por la de EPAC-mAmetrine1.2 o la de EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2. Para ello, diseñamos oligonucleótidos específicos que linealizaron el vector omitiendo secuencia de CFP y le incorporaran los sitios de restricción NheI y SacII en sus extremos (figura 27A y figuras suplementarias 5 y 6). Asimismo, se diseñaron un par de oligonucleótidos para añadir esos mismos sitios de restricción en los extremos de la secuencia de EPAC-mAmetrine1.2 y EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2 (figura 27B). Realizamos una reacción de digestión del vector e inserto por separado y purificamos el vector pDisplay linearizado cortando la banda del gel de agarosa. Posteriormente, ligamos el vector pDisplay con los insertos EPAC-mAmetrine1.2 y EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2 por separado y transformamos células de la cepa DH5 α ; picamos 7 y 6 colonias al azar de cada construcción e inoculamos 3 mL de LB suplementado con antibiótico. Dejamos crecer los cultivos durante toda la noche, extrajimos el DNA plasmídico de cada cultivo y realizamos la selección de clonas positivas mediante el patrón de digestión con HindIII y XhoI, encontramos entre el 50-60% de clonas positivas (figura 27C) y se mandó a secuenciar para corroborar la integridad de la secuencia.

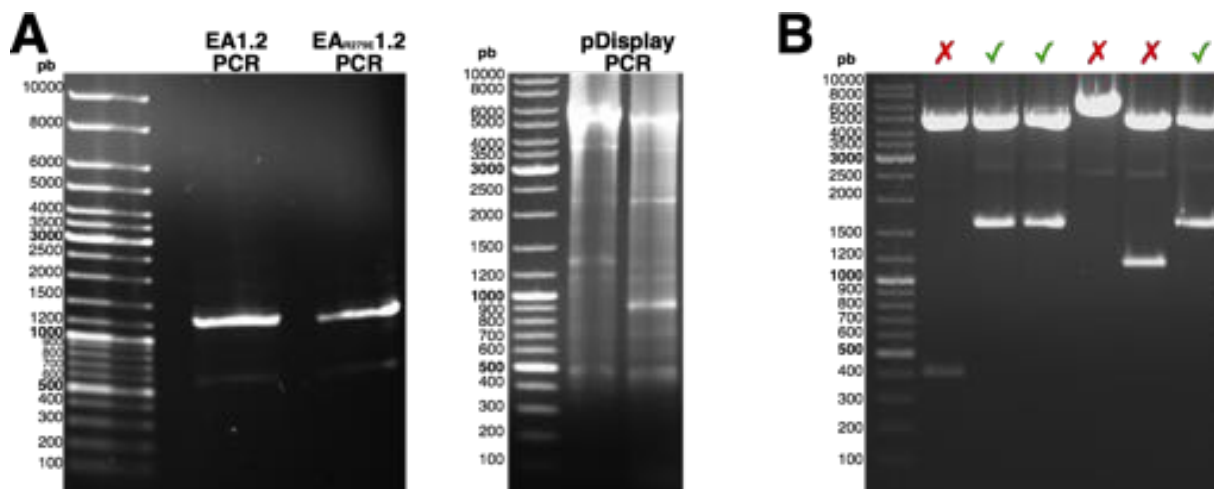


Figura 27. Construcción de pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2 y su mutante.

En el panel A se muestran los productos de las reacciones de PCR para agregar los sitios *NheI* y *SacII* al vector (~5.3 kb) y al inserto (~1,2 kb) con los cebadores Tak291R-Tak194F y Tak103F-Tak197R, respectivamente. El panel B muestra el patrón de digestión con las enzimas *HindIII* y *XhoI* de plásmidos aislados de colonias al azar provenientes de la transformación con la reacción de ligación para formar el plásmido pDisplay-EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2.

Posteriormente, hicimos una prueba piloto transfectando células CHO con los plásmidos EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay y EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2-pDisplay, este último iba a ser utilizado como control negativo. Al realizar el ensayo de unión con las células transfectadas con EPAC-mAmetrine 1.2-pDisplay no observamos cambio en el tiempo de vida media de mAmetrine1.2 (figura suplementaria 7). Incluso utilizamos una configuración de TIRF-FLIM (datos no mostrados), para poder detectar los cambios en la fluorescencia específicos de la membrana, pero tampoco se observó transferencia de energía. Por ello nos preguntamos si la proteína quimérica realmente se estaba localizando en la superficie de la membrana celular.

7. 2. 2. Ensayos de apagamiento por Cu²⁺ de las proteínas fluorescentes en la superficie de la membrana de células CHO

Para confirmar si la proteína quimérica EPAC-mAmetrine1.2 se estaba localizando en la superficie celular, decidimos usar un apagador (“quencher”) de mAmetrine1.2 no permeable a la célula, para poder ver una reducción de la señal específicamente en la superficie de la membrana. En la literatura encontramos que el

Cu^{2+} es un apagador de la GFP (Jung *et al.*, 2005; Isarankura-Na-Ayudhya *et al.*, 2010). Sin embargo, Jung y colaboradores reportaron una reducción de tan solo el 8% en la intensidad de fluorescencia, mientras que Isarankura-Na-Ayudhya observó una reducción del 60% utilizando la misma concentración de Cu^{2+} y proteína fluorescente, esta discrepancia probablemente se debió a que Jung utilizó una mutante con un plegamiento y estabilidad optimizados. Tomando en cuenta lo anterior, realizamos primero unas pruebas de apagamiento con proteína purificada para comprobar que el Cu^{2+} sí apaga la fluorescencia de mAmetrine 1.2 y CFP (figura suplementaria 8).

Una vez confirmado que el Cu^{2+} es un apagador eficiente, transfectamos células CHO con los plásmidos EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay y CFP-pDisplay (plásmido que adquirimos en Addgene), este último lo utilizamos como un control positivo ya que existen diversas publicaciones donde observan claramente la localización de la CFP en la superficie de la membrana de células transfectadas con este plásmido (Chen *et al.*, 2005; Howarth *et al.*, 2005, 2008). Al realizar los ensayos de apagamiento concluimos que EPAC-mAmetrine 1.2 no se estaba localizando en la superficie celular (figura 28), por lo que no es posible realizar el ensayo de unión entre un CNBD y AMPc en la superficie celular utilizando nuestro sistema. Sin embargo, sería interesante probar si con algún otro sistema se puede enviar correctamente las quimeras a la superficie de la membrana celular.

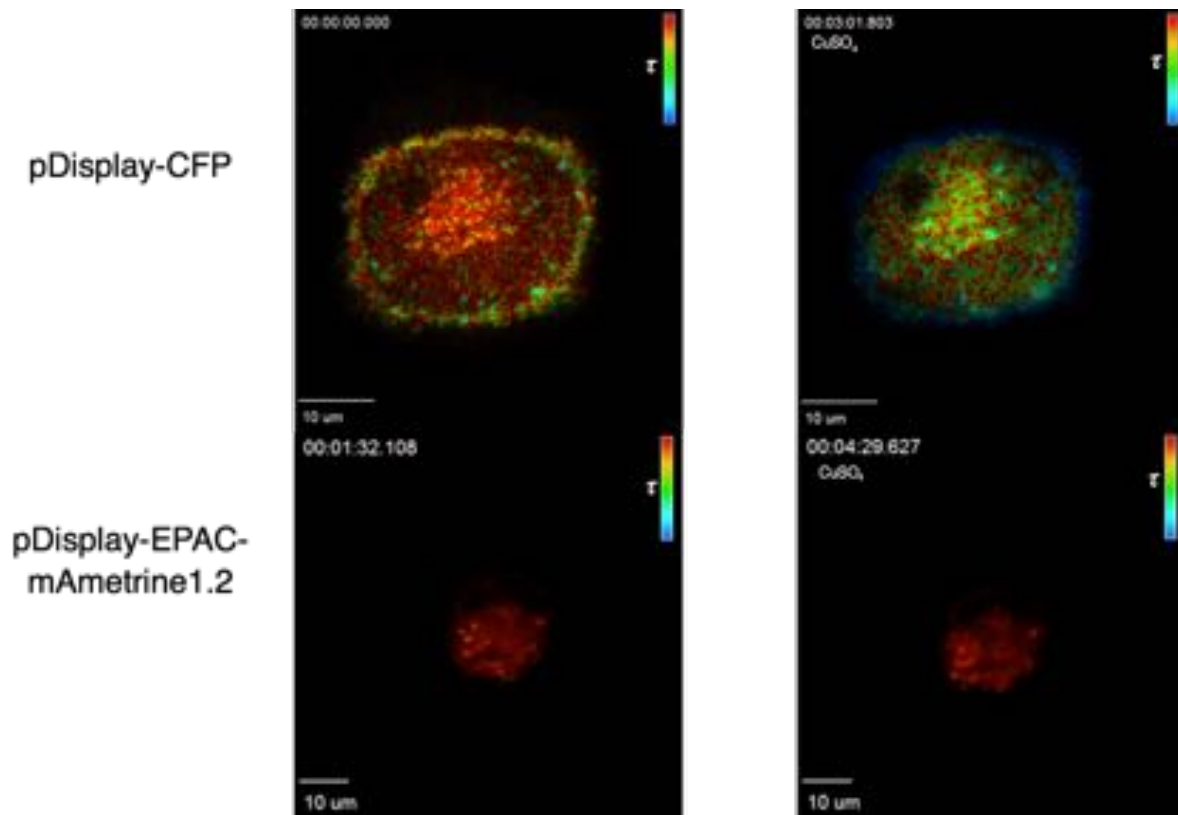


Figura 28. EPAC-mAmetrine1.2 no se expresa en la superficie celular.

Imágenes de microscopía de tiempo de vida media de la fluorescencia (FLIM) de células CHO transfectadas con el plásmido pDisplay-CFP (paneles superiores) y pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2 (páneles inferiores), las primeras se adquirieron en una configuración FLIM-confocal y se puede apreciar el apagamiento de la CFP en la membrana después de la adición de CuSO_4 . Los páneles inferiores muestran células CHO transfectadas con pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2, las imágenes mostradas se adquirieron en una configuración FLIM-TIRF (también se adquirieron en FLIM-confocal, pero no se muestran) ya que nos permitiría una mejor resolución de los cambios de fluorescencia cerca de la membrana, sin embargo al añadir CuSO_4 no se detecta un cambio apreciable en la τ .

8. DISCUSIÓN

Los nucleótidos cíclicos son las moléculas encargadas de regular múltiples funciones celulares independientes, esto lo logran mediante una unión no covalente y reversible a sus proteínas blanco. Generalmente, estas proteínas blanco tienen un dominio encargado de dicha interacción, hasta la fecha se han establecido dos principales dominios conservados con esta función, ellos son los dominios GAF y el dominio CNBD (Rehmann *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha reportado la existencia de un tercer dominio, al cual nombraron dominio Popeye, este dominio se encuentra en las proteínas de membrana Popdcs, que se encargan de regular la actividad de los canales TREK-1 en los cardiomiocitos (Simrick *et al.*, 2013; Brand *et al.*, 2014), por lo que se agrega un participante más en el interactoma del AMPc.

8. 1. Ensayo de unión entre un CNBD y AMPc

Para estudiar la interacción molecular entre estos dominios y los nucleótidos cíclicos se han descrito varios métodos bioquímicos, uno de los más comunes es el de “pull-down”, donde se inmoviliza en microesferas de agarosa el dominio en cuestión (o la proteína completa) mediante una etiqueta de glutatión o de histidinas. Posteriormente se agrega una cantidad conocida de AMPc marcado por radioactividad ($^3\text{[H]}$ -AMPc) o con un fluoróforo (8-[Fluo]-AMPc) para que se una al dominio adsorbido en las perlas de agarosa y se centrifuga. Al final se cuantifica el AMPc marcado del sobrenadante y el que está unido (Pham *et al.*, 2000; Dremier *et al.*, 2003; Donaldson & Meier, 2013).

Este método, al parecer muy sencillo, ha reportado datos contradictorios; Pham y colaboradores reportaron que la función de la proteína CNras-GEF (ahora llamada PDZ-GEF1) estaba directamente regulada por AMPc, pero estos resultados no se pudieron reproducir en otros laboratorios (Dremier *et al.*, 2003). No fue hasta que Kuiperij y colaboradores realizaron experimentos de unión mediante calorimetría

isotérmica de titulación (ITC) que demostraron que la afinidad por AMPc era muy baja ($K_d > 1$ mM) y sin relevancia fisiológica (Kuiperij *et al.*, 2003).

Los ensayos de unión por ITC se basan en la formación y ruptura de enlaces en la proteína y en la solución tras la adición del nucleótido cíclico; el equipo mide la cantidad de energía a lo largo del tiempo que se necesita para mantener constante la temperatura entre la muestra y la celda de referencia. Con el cambio de entalpía debido a la unión del ligando se puede obtener un valor de K_d real y demostrar inequívocamente si existe interacción o no, su mayor desventaja es que se necesita una gran cantidad de proteína concentrada (1.36 mL de 66 μ M – 630 μ M de proteína según artículo de Kuiperij *et al.*, 2003 y entre 40 y 100 μ M según artículo de Cukkemane *et al.*, 2007) con una pureza mayor al 90% por lo que este método no sería adecuado para realizar un tamizaje de alto rendimiento.

Existen otros dos métodos ampliamente utilizados para medir la interacción con nucleótidos cíclicos. Tienen en común que miden el cambio de la fluorescencia dependiendo de la polaridad del ambiente. El primero de ellos utiliza un análogo fluorescente llamado 8-NBD-AMPc, este análogo en solución acuosa es prácticamente no fluorescente, pero al unirse al CNBD (es decir, al estar en un ambiente hidrofóbico) su fluorescencia aumenta entre 10 y 100 veces dependiendo del CNBD (Cukkemane *et al.*, 2011; Tsalkova *et al.*, 2012; Peuker *et al.*, 2013).

Aunque el aumento es grande con respecto a la fluorescencia basal, el cociente señal/ruido sigue siendo muy pobre incluso en un ambiente hidrofóbico, por lo que los trazos generalmente son muy ruidosos y las mediciones dependen principalmente de la sensibilidad del equipo. Aunque este inconveniente parece trivial, ya que uno pensaría que podría resolverlo agregando mayor cantidad del análogo fluorescente mientras se mantiene la proporción receptor:ligando, no es del todo viable ya que a concentraciones mayores de 100 μ M el 8-NBD-AMPc tiene una

absorbancia alta, por lo que se vuelve imposible corregir el efecto de filtro interno a grandes concentraciones (Brelidze *et al.*, 2009).

El segundo método consiste en medir la fluorescencia del triptófano, la cual también es dependiente de la polaridad del solvente. Este método es confiable si el CNBD tiene un residuo de triptófano endógeno cerca del sitio de unión o que su accesibilidad al solvente sea distinta en los estados unido y libre, tal es el caso del CNBD del canal bacteriano MlotiK (Cukkemane *et al.*, 2007), ya que las constantes de disociación obtenidas por ITC y por fluorescencia del triptófano concuerdan (K_d de 100 ± 11 nM y 80 nm, respectivamente). Sin embargo, cuando el CNBD no tiene un W endógeno o tiene varios, es necesario hacer mutantes, por lo que el cambio en la secuencia podría ser perjudicial para el plegamiento o afectar la afinidad por los nucleótidos cíclicos, tal como se observa en el estudio de Brelidze y colaboradores, donde el CNBD del canal mutante mHCN2-L586W tiene una diferencia en la K_d mayor a un orden de magnitud (Brelidze *et al.*, 2009).

8. 1. 1. Ensayo de unión mediante FRET intermolecular

Debido a las deficiencias que tienen los ensayos de unión existentes decidimos desarrollar un nuevo método que nos permitiera seleccionar de manera rápida y eficiente que CNBDs sí están interaccionando con AMPc. Como se mencionó anteriormente, en el laboratorio ya habíamos desarrollado un ensayo de unión basado en FRET, utilizando como donador a EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPc como aceptor. Sin embargo el uso de este par FRET tenía ciertas limitaciones, ya que parte de la fluorescencia del aceptor era debida a la excitación basal y no por la transferencia de energía. En este sentido, el uso de una proteína fluorescente con un corrimiento de Stokes grande nos ayudaría a separar los espectros de excitación del donador y del aceptor, evitando así la excitación directa del aceptor. Para ello preparamos las proteínas quiméricas EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2.

8. 1. 1. 1. mAmetrine vs mAmetrine 1.2

Al cuantificar la concentración de la proteína usando dos métodos (método de Lowry y espectrofotometría de absorción en el rango de luz visible), observamos que para las proteínas EPAC-CFP y con EPAC- mAmetrine 1.2 no había diferencia significativa entre la concentración obtenida por ambos métodos. Sin embargo, para EPAC-mAmetrine la discrepancia entre los valores obtenidos fue significativa, debido posiblemente a una maduración incompleta del fluoróforo. En la literatura encontramos reportados distintos valores de coeficiente de extinción molar para mAmetrine (Ai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011; Shcherbakova *et al.*, 2012) y por comunicación personal con el Dr. Robert Campbell sabemos que han tenido problemas con la reproducibilidad del mismo en otros laboratorios (e incluso en el suyo), debido a una pobre maduración del cromóforo y un plegamiento deficiente, por lo que nos recomendó usar mAmetrine 1.2 para nuestros experimentos ya que sus espectros de fluorescencia son prácticamente los mismos, pero mAmetrine 1.2 tiene una mayor estabilidad en cuanto a plegamiento y fotoblanqueo (su tiempo medio de fotoblanqueo es 3.3 veces mayor al de mAmetrine), además su pK_a disminuyó de 6.2 a 5.8 (aquí pK_a para las proteínas fluorescentes representa la sensibilidad a la acidez del medio y es el pH al cual la fluorescencia disminuye un 50 % con respecto al máximo). Actualmente el mecanismo por el cual mAmetrine 1.2 tiene una mayor fotoestabilidad no es del todo claro (Ding *et al.*, 2011), ya que las diferencias en las secuencias de mAmetrine y mAmetrine 1.2 son 9 mutaciones (K26R, T43I, K52E, S99F, V147A, E172K, D190G, S192P y N212Y), que por homología con otras estructuras de proteínas fluorescentes sabemos que sus cadenas laterales se encuentran dirigidas hacia afuera del barril β y que 6 de ellas (K26R, K52E, V147A, E172K, D190G, S192P) se encuentran en las asas que unen a las hebras β .

Cabe mencionar, que en el grupo obtuvimos el coeficiente de extinción molar para distintas proteínas fluorescentes purificadas y el valor más alto que pudimos obtener para mAmetrine fue $27,563 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, este valor es ~20% menor al reportado; este tipo de discrepancias también la observamos al obtener el coeficiente de extinción molar de mOrange1 con un 53% menor a lo reportado, esta proteína fluorescente tiene un tiempo de maduración relativamente largo. Por otro lado, para mECFP la diferencia fue del 1% (proteína fluorescente con un tiempo de maduración relativamente corto).

8. 1. 1. 2. Comparación de los pares FRET: EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc vs EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc

Con respecto a los ensayos de unión, los espectros adquiridos muestran que sí hay una unión específica entre EPAC-mAmetrine y 8-[Dy-547]-AMPc y EPAC-mAmetrine 1.2 y 8-[Dy-547]-AMPc. Sin embargo, la eficiencia de FRET de EPAC-mAmetrine 1.2 y 8-[Dy-547]-AMPc no se compara con la del par EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc. Esta diferencia no la esperábamos, ya que al calcular la R_0 y J teóricas de cada par FRET (tabla 7), incluso se esperaba que EPAC-mAmetrine 1.2\8-[Dy-547]-AMPc fuera un mejor par FRET, pues sus valores son más grandes. En relación a lo anterior, hay que recordar que para una interacción eficiente entre los sistemas electrónicos del donador y del aceptor se requiere que el campo eléctrico del donador resuene a una frecuencia que permita que los electrones en el aceptor oscilen e induzcan su estado excitado, es decir, la tasa de transferencia de energía mejora con un valor más grande de J (sobreposición de los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor). De hecho, el valor de R_0 (distancia de Förster) de un par FRET particular depende fuertemente de J . En un par FRET, con un donador de eficiencia cuántica aceptable, entre mayor sea la sobreposición de los espectros, la eficiencia de FRET será mayor y esto se verá reflejado en un valor de R_0 más

grande, por lo que idealmente EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc sería un mejor par FRET.

Tabla 7. Valores de R_0 de cada par FRET

	R_0 (nm)	$J \cdot 10^{-13}$ ($M^{-1} \text{ cm}^3$)
EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc	5.2	2.3
EPAC-mAmetrine 1.2\8-[Dy-547]-AMPc	6.3	6.2

8. 1. 1. 2. 1. Dy-547 como aceptor de mAmetrine1.2

La baja eficiencia de FRET del par EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc, podría ser explicada por la naturaleza del aceptor, ya que la cadena abierta de trimetino del colorante Dy-547 puede sufrir isomerizaciones *trans/cis* reversibles (Redmond *et al.*, 1997; Sahyun & Serpone, 1997), siendo el isómero *trans* el fluorescente y el *cis* no fluorescente o un estado oscuro del fluoróforo (“dark state fluorophore”) (Börsch & Wrachtrup, 2011; Gatzogiannis *et al.*, 2012).

La existencia de dos estados (uno fluorescente y el otro no) en un fluoróforo se conoce como parpadeo (“flickering” o “blinking”) y es una característica fotofísica de algunos fluoróforos, el cambio entre los dos estados puede ser estocástico o inducido por cierta longitud de onda de excitación (fotoinducción) o dependiente del medio; la fracción de fluoróforo en el estado oscuro puede variar entre el 30% – 60% en una solución acuosa (Widengren & Schwille, 2000; Vogel *et al.*, 2012). La escala temporal en la que suceden estas transiciones es del orden de milisegundos a segundos, por lo que es más lenta que el tiempo de decaimiento de la vida media de la mayoría de los fluoróforos, lo que trae como consecuencia que el fluoróforo esté en el estado fluorescente o en el estado oscuro y que la probabilidad de transición entre el estado fluorescente al oscuro durante el estado excitado sea prácticamente nula. Por lo tanto, un fluoróforo aceptor con parpadeo, tendría un

efecto drástico en la eficiencia de FRET si y sólo si el estado oscuro evita que el fluoróforo sirva como un aceptor real (Vogel *et al.*, 2012).

El impacto que puede tener la heterogeneidad del aceptor en la eficiencia de FRET se ha estudiado mediante simulaciones de Monte Carlo (Vogel *et al.*, 2012), donde ven el comportamiento de la eficiencia de FRET de eventos separados en diversas poblaciones de donador-aceptor con parámetros predeterminados y variando la fracción del aceptor que está en un estado oscuro del 0% al 50%. En el caso de la población donde la fracción del aceptor en estado oscuro es del 0%, para los parámetros dados ($\tau_D=3$ ns, $R_{DA}=5.4\pm 1\%$, $R_0=5.4$), la distribución de la eficiencia de FRET es unimodal y simétrica, con $E=0.5$ siendo el valor más frecuente, el cual también es el promedio de la población (100,000 réplicas al azar). Para las poblaciones donde la fracción de aceptores en el estado oscuro empieza a aumentar, la distribución se convierte en bimodal y la frecuencia de la $E=0.5$ empieza a disminuir, mientras que la frecuencia de $E=0$ a aumentar (Vogel *et al.*, 2012), por lo que el promedio de la eficiencia de FRET global puede ser incluso la mitad ($E=0.25$) del valor obtenido cuando la fracción de aceptor en su estado oscuro es nula ($E=0.5$).

Entonces, si esto sucediera en nuestro ensayo de unión, habría tres subpoblaciones posibles de interacción molecular: una población con EPAC-mAmetrine 1.2 unido al aceptor en su estado fluorescente (*trans*-Dy-547, por lo que habría FRET), EPAC-mAmetrine 1.2 libre y una tercera población donde a pesar de que el ligando está unido al CNBD no hay FRET debido a que el aceptor está en su estado oscuro (*cis*-Dy-547), por lo que en forma global la eficiencia de FRET disminuiría.

Asimismo, el colorante Dy-547 es capaz de adoptar numerosos modos vibracionales durante el estado excitado (Cooper *et al.*, 2004), lo que resulta en la pérdida de energía por procesos no-radiativos y por lo tanto una eficiencia cuántica

baja. Esto último explicaría el bajo incremento en la fluorescencia del aceptor cuando hay FRET (hay que recordar que sabemos que sí hay FRET al medir la reducción de la intensidad y tiempo de vida media de la fluorescencia del donador en presencia del aceptor).

Una excelente alternativa para el par FRET con EPAC-mAmetrine1.2 sería utilizar un análogo fluorescente de AMPc con Cy3B (Börsch & Wrachtrup, 2011), ya que su estructura y propiedades espectroscópicas (salvo la eficiencia cuántica, ver tabla 8) son prácticamente iguales a la de Dy-547, la diferencia radica en que la cadena trimetino se ha rigidizado en su estructura, por lo que el fluoróforo tiene una sola conformación tanto en el estado basal como en el excitado, por lo que la pérdida de energía por procesos no radiativos se reduce, su eficiencia cuántica se incrementa (Cooper *et al.*, 2004) y lo más importante, ya no tendríamos una población del aceptor en un estado oscuro.

Tabla 8. Comparación entre Dy-547 y Cy3B

	Abs _{λ_{\max}} (nm)	Em _{λ_{\max}} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ	Brillo (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
Dy-547	557	574	150,000	~0.2	30
Cy3B	558	572	130,000	0.67	90

En un proyecto paralelo del laboratorio, se sintetizó un análogo fluorescente de AMPc con rodamina 6G unida al C8 de la base nitrogenada por un espaciador de 5 átomos, los ensayos realizados con este análogo mostraron una mayor eficiencia de FRET que con Dy-547 (comunicación personal con el M. en C. Francisco Romero), pero se observó excitación basal del aceptor. Por lo que sería interesante explorar el uso de Cy3B como aceptor para mAmetrine 1.2.

8. 1. 1. 2. 2. Ventajas del nuevo par FRET

A pesar de que la eficiencia de FRET no fue la esperada, el uso del par FRET mAmetrine1.2–Dy-547 es una excelente opción para estudiar interacciones intermoleculares, ya que la señal de fluorescencia es independiente de la proporción

de donador:aceptor en la muestra, esto se puede observar en la figura 22, los espectros de emisión del ensayo de unión en presencia de competidor normalizados son idénticos para las 3 distintas proporciones usadas en los experimentos con EPAC-mAmetrine y EPAC-mAmetrine1.2, pero para los espectros con EPAC-CFP se observa que su forma cambia dependiendo de la cantidad de aceptor en la muestra. Esto se debe a la excitación basal del aceptor, por lo que algunas moléculas del aceptor fluorescen sin que haya transferencia de energía.

Este cambio en la forma del espectro parece un problema trivial si las mediciones se hacen *in vitro* en un espectrofluorómetro, ya que las concentraciones de donador:aceptor pueden ser ajustadas con facilidad, además de que el uso de un monocromador nos permite seleccionar longitudes de onda específicas, donde el efecto del sangrado del aceptor es mínimo (o nulo) para obtener un valor de FRET real. En cambio, la excitación basal del aceptor se vuelve un inconveniente mayor si los ensayos se realizan mediante microscopía de fluorescencia en células vivas expresando la construcción, ya que no podríamos ajustar adecuadamente la proporción de donador:aceptor durante el ensayo y los filtros ópticos pasabanda comerciales, por lo general, tienen una anchura a la mitad del máximo de transmitancia (FWHM, Full Width at Half Maximum) de 25 hasta 90 nm, por lo que el sangrado del aceptor en el canal del donador se acentúa. Esto último se puede apreciar en nuestros resultados de tiempo de vida media por microscopía de fluorescencia, donde en el ensayo de unión con EPAC-CFP\8-[Fluo]-AMPc al incrementar la concentración del aceptor la eficiencia de FRET disminuye en vez de aumentar, este artefacto no se observa cuando utilizamos el par FRET EPAC-mAmetrine1.2\8-[Dy-547]-AMPc. En relación al par FRET con EPAC-mAmetrine 1.2, cabe mencionar que por primera vez se determinó el tiempo de vida media de esta proteína fluorescente, el cual fue de 3.8 ns y entra en el rango (2–4 ns) de los valores

conocidos de las variantes de la GFP de *Aequorea victoria* (Rizzo *et al.*, 2004; Bayle *et al.*, 2008; Berezin & Achilefu, 2010).

Otra complicación que sólo existe para las CFP es que su tiempo de decaimiento de vida media de la fluorescencia (τ) se ajusta a más de una exponencial (Rizzo *et al.*, 2004; Goedhart *et al.*, 2010), lo que quiere decir que en realidad hay más de un tipo de poblaciones de cromóforos de CFP. Una de las propuestas que existen para explicar la existencia de dos constantes τ es la presencia de rotámeros del cromóforo. Sin embargo, cuando resolvieron la estructura cristalográfica de la CFP, sorprendentemente encontraron dos configuraciones para los residuos tirosina 145 (Y145) e histidina 148 (H148), los cuales forman parte de la hebra β 7 del barril y sus cadenas laterales influyen en el microambiente del cromóforo (Hyun Bae *et al.*, 2003), por lo que en realidad estas dos conformaciones podrían ser las dos distintas especies del cromóforo. En la conformación mayoritaria, llamada A', la cadena lateral de la Y145 se encuentra en el interior del barril β orientándose hacia el cromóforo (de la misma manera que en la EGFP), mientras que la cadena lateral de la H148 se encuentra orientada hacia fuera del barril β (al contrario que en la EGFP, donde esta histidina tiene interacción directa con el cromóforo). Lo inverso sucede en la conformación minoritaria, llamada B', donde el fenol de la Y145 se orienta hacia fuera y el grupo imidazol de la H148 hacia adentro del barril β . En esta conformación, la Y145 se aleja demasiado, por lo que ya no está en el rango de contacto hidrofóbico con el fluoróforo (Hyun Bae *et al.*, 2003), lo que alteraría sus propiedades espectroscópicas. Para entender por que hay dos valores de vida media τ hay que recordar que el fluoróforo de las CFP está compuesto por los residuos T65-W66-G67, y que el grupo indol del triptófano es extremadamente sensible a la polaridad del ambiente, por lo que a medida que la hidrofobicidad incrementa, el espectro de emisión se recorre a longitudes de onda más bajas (corrimiento hacia el azul) (Kosinski-Collins *et al.*, 2004; Lakowicz, 2006).

La existencia de dos constantes de vida media complica el tratamiento de los datos para saber la eficiencia real de FRET, por lo que es recomendable usar otra proteína fluorescente como mTurquesa.

8. 1. 1. 3. Mutante EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2

Por otro lado, también realizamos una construcción con la arginina del PBC mutada a un ácido glutámico (R279E), esto para volver a corroborar la unión específica del nucleótido cíclico al CNBD. Este cambio de residuo evitaría por completo la unión del nucleótido cíclico ya que el H del grupo amino (NH₂) de la arginina es el donador para la formación del puente de hidrógeno con el O exocíclico del fosfato del AMPc, además la carga negativa de la cadena lateral del ácido glutámico generaría una repulsión electrostática con el grupo fosfato que también tiene carga negativa, razón por la cual al realizar los ensayos de unión con EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2 no hay FRET. En otros trabajos ya habían realizado esta mutante para estudiar la función y localización de la proteína EPAC I completa (Qiao *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2005, 2006), donde esta mutante inhibía la movilización del Ca²⁺ intracelular mediada por EPAC (Kang *et al.*, 2005) y promovía una sublocalización errónea durante el ciclo celular (Qiao *et al.*, 2002). Sin embargo, ellos nunca investigaron si la mutación era perjudicial para el plegamiento o no, por lo que tomamos el espectro de dicroísmo circular de EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2 y lo comparamos con el de EPAC-mAmetrine1.2. Observamos ligeras diferencias en la magnitud de la señal de elipticidad molar, que se atribuyen a un error experimental durante la cuantificación y preparación de la muestra, ya que los resultados de la deconvolución demuestran que se conserva el porcentaje de la estructura secundaria lo que sugiere que las diferencias son por un error en la concentración. En la literatura hay reportes con los espectros de dicroísmo circular de CNBDs aislados de otras proteínas (Johnson & Wong, 1989; Cukkemane *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009), aunque no se puede hacer una comparación directa con los

espectros que se obtuvieron para este trabajo (ya que son del CNBD más la proteína fluorescente), cabe mencionar que en todos los espectros reportados hay una meseta que va de 207 nm a 225 nm aproximadamente en la configuración libre de AMPc (tal como sucede en nuestros datos obtenidos) y que en el estado unido aparece un mínimo entre 225 y 228 nm.

Esta mutante nos ayudó a comprobar la especificidad de la prueba, por lo que decidimos probar otros CNBD no caracterizados. Para facilitar la selección de colonias positivas desarrollamos un plásmido que nos permitirá seleccionar a simple vista las clonas con los CNBDs, esta herramienta nos facilitará el trabajo futuro (ver apéndice).

8. 2. Expresión de la proteína EPAC-mAmetrine1.2 en la superficie de la membrana plasmática

Lamentablemente, la localización de las proteínas en la superficie celular no se logró. Por microscopía observamos que al transfectar las células con los plásmidos CNBD-mAmetrine1.2-pDisplay había fluorescencia dentro de la célula y que estaba dentro de vesículas cercanas a la membrana plasmática. En contraste, al transfectar las células con el plásmido de Addgene que sólo tiene la CFP, la fluorescencia se ubicaba tanto dentro de la célula (proteínas que están aún en el tráfico vesicular) y en la membrana plasmática. Con los ensayos de apagamiento por Cu^{2+} , comprobamos que sólo las células transfectadas con CFP-pDisplay estaban expuestas en la superficie de la membrana.

El vector pDisplay tiene antes de los sitios de clonación la secuencia que codifica para el péptido señal de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina de ratón, esta secuencia permite que la proteína ingrese a la vía de secreción mediante su translocación en el retículo endoplásmico donde es escindida. Después de ésta se encuentra la secuencia que codifica para el epítipo de hemaglutinina y posterior a los sitios de clonación se encuentran las secuencias que codifican para el epítipo

Myc y el dominio transmembranal de la proteína derivada de plaquetas que funciona como receptor del factor de crecimiento (PDGFR), que es el responsable de anclar a la membrana plasmática la proteína fusionada. Este plásmido se ha utilizado con éxito para exportar proteínas de interés a la superficie celular, tales como anticuerpos (Zhang *et al.*, 2014), proteínas adaptadoras que permiten anclar “quantum dots” en la membrana plasmática (Howarth *et al.*, 2005) y sensores fluorescentes de actividad de metaloproteasas (Yang *et al.*, 2007), de pH extracelular (Shen *et al.*, 2014) y de glutamato (Marvin *et al.*, 2013).

En este último reporte, encontraron que el epítipo de hemaglutinina (HA) era perjudicial para la actividad del sensor ya que disminuía su afinidad por el glutamato, por ello prepararon una construcción sin el epítipo para recuperar la afinidad por glutamato. Sin embargo, con ambos plásmidos (con y sin HA) la proteína se localizaba en la superficie celular, por lo que es muy poco probable que ese haya sido el problema en nuestro caso, aunque valdría la pena comprobarlo experimentalmente.

Una explicación más plausible es que la secuencia del CNBD tenga algún péptido señal que retiene a la proteína quimérica dentro de la célula. Al analizar la secuencia de aminoácidos de EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay, no encontramos las secuencias clásicas de retención en el retículo endoplásmico o en el Golgi (e. g. KDEL o KKXX). Sin embargo, encontramos un motivo ácido de dileucinas ([D\E]XXXL[L\I]) que promueve la internalización de las proteínas en la secuencia del manojo de hélices α en el extremo amino del CNBD de EPAC I y EPAC II (figura 29); como se mencionó en los antecedentes, la construcción tiene estas hélices porque la vuelven más soluble y mejoran su expresión en *E. coli* (Kraemer *et al.*, 2001).

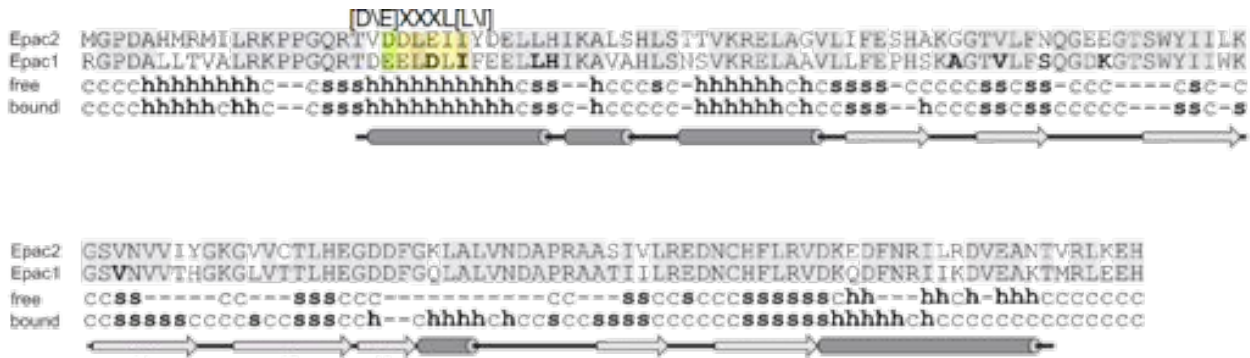


Figura 29. Alineamiento de los CNBD de EPAC 1 y EPAC 2 que muestra el motivo [DVE]XXXL[LVI]
 Se muestra en amarillo el motivo [DVE]XXXL[LVI] localizado en el manajo de hélices en el amino terminal del CNBD de EPAC 1 y 2, en la parte inferior de los alineamientos se muestra la estructura secundaria del dominio. (Imagen modificada de Harper *et al.*, 2008).

Los motivos ácidos de dileucinas son señales que facilitan la endocitosis rápida de las proteínas de membrana que los poseen mediante su unión con proteínas adaptadoras (AP-2) que forman un vínculo entre éstas y la maquinaria de formación de vesículas dependiente de clatrina. Este motivo se encuentra conservado en protistas, levaduras y metazoarios, sus secuencias consenso son DXXLL y [DVE]XXXL[LVI] y se encuentran en las regiones citosólicas, ya sea del amino o carboxilo terminal, en proteínas con uno o varios segmentos transmembranales (Bonifacino & Traub, 2003). Esta señal se encarga de la clasificación y transporte de diversas proteínas transmembranales a endosomas tardíos y lisosomas, así como a compartimentos endolisosomales especializados tal como los compartimentos endocíticos para el procesamiento de antígenos, gránulos sinápticos densos, vesículas que se liberan con estímulos y los premelanosomas y melanosomas.

Existen reportes donde mutan las leucinas y/o el residuo ácido del motivo por alaninas y así evitan la internalización de las proteínas por endosomas y promueven su transporte hacia la membrana plasmática (Johnson & Kornfeld, 1992; Chen *et al.*, 1997; Augustin *et al.*, 2005; Vergarajauregui & Puertollano, 2006; Flessner & Moley, 2009; Feliciangeli *et al.*, 2010). Uno de los reportes más interesantes es el de los canales de K⁺ TWIK-1, que por mucho tiempo se creyó que eran canales no funcionales ya que no se podía detectar corriente cuando eran expresados

heterológamente (Feliciangeli *et al.*, 2015). Estos canales tienen un motivo [D\E]XXXL[L\I] en su extremo carboxilo por lo que el canal se encuentra secuestrado en vesículas intracelulares ya que constitutivamente es endocitado, al mutar los residuos del motivo se incrementó el número de canales que llegaban a la membrana plasmática y por lo tanto se pudo registrar la corriente de TWIK-1 (Feliciangeli *et al.*, 2010). Aunque por el diseño del plásmido EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay, el motivo [D\E]XXXL[L\I] quedaría del lado extracelular (por lo que la señal de internalización quedaría fuera del alcance de AP-2), podría ser que durante el tránsito a la membrana plasmática el motivo evite que llegue a su destino funcionando como un motivo de retención. Por tal razón, sería interesante mutar el motivo [D\E]XXXL[L\I] de EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay para poder concluir si es posible realizar los ensayos de interacción molecular con las proteínas quiméricas expresadas en la superficie celular.

8. 3. Proteínas con CNBD no caracterizados en el espermatozoide

Como se mencionó brevemente en la introducción, dependiendo de la especie, algunas de las entidades moleculares involucradas en la fecundación tienen un dominio tipo CNBD, lo que indicaría una regulación directa por nucleótidos cíclicos. Una de estas proteínas es el spHCN1 el cual se encargaría de despolarizar la membrana plasmática en los espermatozoides de erizo de mar, este canal iónico es activado por hiperpolarización y está regulado de manera específica por AMPc, ya que su $K_{1/2}$ de activación es de 0.7 μ M para este nucleótido y es 10,000 veces más selectivo a AMPc que a GMPc (Gauss *et al.*, 1998). De manera interesante, en el laboratorio del Dr. Darszon, se descubrió un parólogo de esta proteína a la que se le denominó spHCN2 pero sus corrientes iónicas no han sido descritas (Galindo *et al.*, 2005).

Los CNBDs de estas dos proteínas, tienen una identidad de secuencia proteica del 44% y una similitud del 62%, ambos poseen los residuos importantes

que definen a un CNBD canónico, es decir, conservan las glicinas de las asas (aminoácidos estructurales), el ácido glutámico del PBC (forma un puente de hidrógeno con el grupo 2'OH de la ribosa) y lo más importante, conservan la arginina del PBC (la cadena lateral de este residuo interacciona directamente con uno de los oxígenos exocíclicos del fosfato cíclico).

En uno de los proyectos del grupo se quiso utilizar el CNBD del spHCN2 para construir un sensor fluorescente de AMPc, lamentablemente esto no se logró debido a que no se pudo detectar la interacción entre este CNBD y el AMPc (Monroy, 2016). Sin embargo, existe un reporte de un CNBD bacteriano presente en el canal iónico MlotiK, el cual está relacionado con la familia de canales iónicos HCN (como el spHCN2). Su afinidad por AMPc es tan alta ($K_d \sim 60$ nM) que, incluso después de ser purificado, la molécula de AMPc sigue unida al dominio (Cukkemane *et al.*, 2007). En relación a lo anterior, cuando cristalizaron la región citoplasmática del canal observaron que el CNBD se encontraba con un AMPc unido aunque el proceso de cristalización se llevó a cabo en ausencia de éste (Clayton *et al.*, 2004). Para estudiar la conformación libre de AMPc trataron de romper la interacción y sometieron a la proteína purificada a una diálisis extensa, pero sus esfuerzos fueron en vano. Posteriormente, Cukkemane y colaboradores desnaturalizaron este CNBD y observaron que más del 80 % de los CNBD estaban unidos a AMPc después de la purificación (Cukkemane *et al.*, 2007).

Al revisar la secuencia del CNBD spHCN2 nos percatamos que en el PBC hay dos R contiguas y que tiene una R en la hélice αC , la cual está conservada solamente en los CNBD de alta afinidad como el spHCN1, MlotiK y el mHCN2 (Cukkemane *et al.*, 2011). Por lo que sería interesante realizar el ensayo de unión con el dominio renaturalizado.

Además de los ya mencionados spHCN1 y spHCN2, sería interesante caracterizar los CNBD del sNHE de erizo de mar y mamífero (ratón y humano) para

su comparación, ya que la secuencia del sNHE del erizo de mar indica que puede ser un CNBD canónico pues conserva el patrón de aminoácidos hidrofóbicos, las glicinas estructurales y un PBC *bona fide*. En cambio, las secuencias de los CNBD de humano y ratón no tienen un PBC conservado, en el caso del de humano carece de la R importante para la interacción con el AMPc (en su lugar tiene una metionina) y en el caso del PBC ratón hay una R, pero no se encuentra en la misma posición dentro del asa del PBC. Esto implicaría que los CNBD del sNHE de ratón y humano podrían tener una baja afinidad a AMPc ($K_d > 100 \mu\text{M}$), mientras que el de erizo de mar podría tener una afinidad en el rango de submicromolar a micromolar. Esta diferencia en las afinidades concuerda con una de las hipótesis actuales del campo, la existencia de nanodominios en el flagelo del espermatozoide de mamífero. Esta hipótesis propone que las entidades importantes para el mantenimiento del batido flagelar se encuentran agrupadas en el flagelo, estas entidades son el sNHE, la ACs y Catsper. Se propone que al estimularse la ACs por HCO_3^- , la concentración de AMPc es muy alta en las inmediaciones de la enzima por lo que el AMPc sería capaz de activar el CNBD de baja afinidad del sNHE, hay que recordar la íntima interacción que existe entre estas dos proteínas. Al activarse el sNHE permite la entrada de Na^+ y la salida de H^+ , por lo que crea una zona con pH alcalino el cual activaría a Catsper. La existencia de nanodominios de pH se ha comprobado para los canales Hv (De-la-Rosa *et al.*, 2016), que a pesar de ser canales iónicos su conductancia es muy baja, por lo que sería posible que lo mismo estuviese ocurriendo para el sNHE.

Por otra parte, en el erizo de mar, el tetraKCNG es activado por GMPc y es selectivo a K^+ , está formado por 4 repeticiones de 6 segmentos transmembranales cada una. Cada repetición está formada, por dos dominios transmembranales, el primero comprende del segmento 1 al 4 (S1-S4) y es el dominio sensor de voltaje, el segundo dominio va del S5-S6 y se denomina dominio formador del poro, los extremos amino y carboxilo de cada repetición se encuentran del lado citosólico y

en este último se encuentra un CNBD en cada repetición (Galindo *et al.*, 2007); este arreglo de dominios es muy parecido al de los canales iónicos CNG y HCN, sólo que en éstos cada repetición es un péptido independiente, mientras que en los tetraKCNG las 4 repeticiones se encuentran en la misma cadena peptídica tal como sucede en los canales Cav y Nav. Otra diferencia importante con los canales CNG eucariontes es que los tetraKCNG necesitan únicamente de la unión de una sola molécula de GMPc al CNBD de la tercera repetición para activarse (Strünker *et al.*, 2006; Bönigk *et al.*, 2009), en cambio los CNG necesitan de al menos dos GMPc.

Recientemente se publicó un artículo sobre el tetraKCNG del pez cebra, donde éste no es activado por GMPc ni ningún otro NMPc sino por pH a pesar de que el CNBD de su tercera repetición parece ser un CNBD canónico (Fechner *et al.*, 2015). De manera interesante, se encontró en la secuencia del C-linker, la parte de la proteína que une al CNBD con el dominio del poro, un inserto de 42 aminoácidos que no existe en el tetraKCNG de erizo de mar ni ningún otro canal CNG o HCN, por lo que podría ser el responsable de evitar la transmisión de la señal del CNBD al poro cuando el GMPc se une, pero para confirmar o rechazar esta hipótesis es necesario determinar primero la afinidad al GMPc del CNBD aislado.

9. CONCLUSIONES

1) El ensayo de unión utilizando una proteína con corrimiento de Stokes grande fue exitoso, lo que valida a mAmetrine 1.2 como donador para el aceptor Dy-547 como un nuevo par FRET funcional, el cual podría usarse en otro tipo de ensayos.

2) No hay excitación basal del aceptor al realizar el ensayo de unión con el par FRET mAmetrine 1.2 y Dy-547.

3) Se determinó por primera vez el tiempo de vida media (τ) de mAmetrine 1.2, el cual fue de 3.8 ns.

10. PERSPECTIVAS

1) Sintetizar un análogo fluorescente de AMPc con Cy3B, y realizar el ensayo de unión con este nuevo análogo utilizando como aceptor a mAmetrine 1.2.

2) Para hacer más robusto el método, clonar los CNBDs que ya se sepa que interaccionan con AMPc (como el de PKA, CAP, MlotiK, spHCN1, etc) y realizar los ensayos de unión, obtener sus constantes de disociación (K_d) por competencia y compararlas con las reportadas.

3) Evaluar con nuestro ensayo de unión los CNBDs no caracterizados de las proteínas específicas del espermatozoide como el tetraKCNG de pez cebra y el sNHE de erizo de mar, ya que ambos conservan los aminoácidos esenciales para la interacción con el AMPc. Además realizar el ensayo de unión con la proteína quimérica spHCN2-mAmetrine1.2 renaturalizada para poder descartar la presencia de AMPc unido al CNBD desde la purificación tal como sucede con el CNBD de MlotiK.

4) Mutar los residuos del motivo de dileucina ([DE]XXXL[LI]) de la construcción EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay, para corroborar experimentalmente si esta secuencia es la responsable de secuestrar a la proteína quimérica en las vesículas intracelulares.

5) Del mismo modo, rediseñar esta construcción (EPAC-mAmetrine1.2-pDisplay) para eliminar las secuencias que codifican para los epítomos de hemaglutinina y Myc, para evaluar si la expresión y el despliegue en la membrana celular mejora con estas modificaciones.

6) Probar el par FRET mAmetrine1.2 – Dy-547 (y/o Cy3B) en otro tipo de interacción intermolecular.

11. REFERENCIAS

- Ai, H.-W., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. & Campbell, R.E. 2008. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature Methods* **5**: 401–3.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2015. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, EUA.
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bonigk, W. & Kaupp, U.B. 1991. Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 9868–9872.
- Augustin, R., Riley, J. & Moley, K.H. 2005. GLUT8 contains [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **6**: 1196–1212.
- Babcock, D.F., Bosma, M.M., Battaglia, D.E. & Darszon, a. 1992. Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6001–5.
- Bayle, V., Nussaume, L. & Bhat, R. a. 2008. Combination of novel green fluorescent protein mutant T-Sapphire and DsRed variant mOrange to set up a versatile in planta FRET-FLIM assay. *Plant Physiology* **148**: 51–60.
- Berezin, M.Y. & Achilefu, S. 2010. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical Reviews* **110**: 2641–84.
- Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A. & Taylor, S.S. 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 45–50.
- Biskup, C., Kusch, J., Schulz, E., Nache, V., Schwede, F., Lehmann, F., Hagen, V. & Benndorf, K. 2007. Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature* **446**: 440–443.
- Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., Kaupp, U.B., Bohmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E. & Kaupp, U.B. 2005. Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *The EMBO Journal* **24**: 2741–2752.
- Bonifacino, J.S. & Traub, L.M. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry* **72**: 395–447.
- Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T. & Kaupp, U.B. 2009. An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis. *Science Signaling* **2**: ra68.
- Börsch, M. & Wrachtrup, J. 2011. Improving FRET-based monitoring of single chemomechanical rotary motors at work. *ChemPhysChem* **12**: 542–553.

- Brand, T., Poon, K., Simrick, S. & Schindler, R. 2014. The popeye domain containing genes and cAMP signaling. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* **1**: 121–133.
- Braslavsky, S.E., Fron, E., Rodríguez, H.B., Román, E.S., Scholes, G.D., Schweitzer, G., Valeur, B. & Wirz, J. 2008. Pitfalls and limitations in the practical use of Förster's theory of resonance energy transfer. *Photochemical & Photobiological Sciences* **7**: 1444–8.
- Brelidze, T.I., Carlson, A.E., Sankaran, B. & Zagotta, W.N. 2012. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* **481**: 530–3.
- Brelidze, T.I., Carlson, A.E. & Zagotta, W.N. 2009. Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 27989–27997.
- Brelidze, T.I., Gianulis, E.C., DiMaio, F., Trudeau, M.C. & Zagotta, W.N. 2013. Structure of the C-terminal region of an ERG channel and functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 11648–53.
- Brüggemann, A., Pardo, L.A., Stühmer, W. & Pongs, O. 1993. *Ether-à-go-go* encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* **365**: 445–448.
- Bubis, J., Neitzel, J.J., Saraswat, L.D. & Taylor, S.S. 1988. A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 9668–73.
- Canaves, J.M. & Taylor, S.S. 2002. Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *Journal of Molecular Evolution* **54**: 17–29.
- Carlson, A.E., Brelidze, T.I. & Zagotta, W.N. 2013. Flavonoid regulation of EAG1 channels. *The Journal of General Physiology* **141**: 347–58.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802–805.
- Chen, H.J., Yuan, J. & Lobel, P. 1997. Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 7003–12.
- Chen, I., Howarth, M., Lin, W. & Ting, A.Y. 2005. Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nature Methods* **2**: 99–104.
- Chen, W. & Georgiou, G. 2002. Cell-surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnology and Bioengineering* **79**: 496–503.

- Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.-G. & Døskeland, S.O. 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 35394–402.
- Clayton, G.M., Silverman, W.R., Heginbotham, L. & Morais-Cabral, J.H. 2004. Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. *Cell* **119**: 615–627.
- Clegg, R.M. 2009. Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. In: *FRET and FLIM techniques* (T. W. J. Gadella, ed). Elsevier, Oxford, UK, pp. 1–57.
- Cooper, M., Ebner, A., Briggs, M., Burrows, M., Gardner, N., Richardson, R. & West, R. 2004. Cy3B (TM): Improving the performance of cyanine dyes. *Journal of Fluorescence* **14**: 145–150.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881–10890.
- Craggs, T.D. 2009. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews* **38**: 2865–75.
- Craven, K.B. & Zagotta, W.N. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annual Review of Physiology* **68**: 375–401.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. & Tsien, R.Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **20**: 448–55.
- Cui, J., Kagan, A., Qin, D., Mathew, J., Melman, Y.F. & McDonald, T. V. 2001. Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 17244–17251.
- Cui, J., Melman, Y., Palma, E., Fishman, G.I. & McDonald, T. V. 2000. Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways. *Current Biology* **10**: 671–674.
- Cukkemane, A., Grüter, B., Novak, K., Gensch, T., Bönigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U.B. & Seifert, R. 2007. Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K⁺ channel. *EMBO Reports* **8**: 749–55.
- Cukkemane, A., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 2011. Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels. *Trends in Biochemical Sciences* **36**: 55–64.
- De-la-Rosa, V., Suárez-Delgado, E., Rangel-Yescas, G.E. & Islas, L.D. 2016. Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity. *The Journal of General Physiology* **147**: 127–136.
- Dehouck, Y., Grosfils, A., Folch, B., Gilis, D., Bogaerts, P. & Rومان, M. 2009. Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using

- statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0. *Bioinformatics* **25**: 2537–2543.
- Dehouck, Y., Kwasigroch, J.M., Gillis, D. & Rooman, M. 2011. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics* **12**: 151.
- Deshayes, C., Bielecka, M.K., Cain, R.J., Scotti, M., De las Heras, A., Pietras, Z., Luisi, B.F., Núñez Miguel, R. & Vázquez-Boland, J.A. 2012. Allosteric mutants show that PrfA activation is dispensable for vacuole escape but required for efficient spread and *Listeria* survival *in vivo*. *Molecular Microbiology* **85**: 461–477.
- Ding, Y., Ai, H., Hoi, H. & Campbell, R.E. 2011. Förster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical Chemistry* **83**: 9687–93.
- Donaldson, L. & Meier, S. 2013. An affinity pull-down approach to identify the plant cyclic nucleotide interactome. In: *Cyclic nucleotide signaling in plants methods and protocols in molecular biology* (C. Gehring, ed). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 155–173.
- Dremier, S., Kopperud, R., Doskeland, S.O., Dumont, J.E. & Maenhaut, C. 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Letters* **546**: 103–107.
- Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.-D. & Heinz, D.W. 2005. The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Molecular Microbiology* **56**: 433–446.
- Espinal-Enríquez, J., Aldana, M., Guerrero, A., Wood, C., Darszon, A. & Martínez-Mekler, G. 2011. Discrete dynamics model for the speract-activated Ca²⁺ signaling network relevant to sperm motility. *PLoS One* **6**: e22619.
- Espinal-Enríquez, J., Darszon, A., Guerrero, A. & Martínez-Mekler, G. 2014. In silico determination of the effect of multi-target drugs on calcium dynamics signaling network underlying sea urchin spermatozoa motility. *PLoS One* **9**: e104451.
- Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A.M., Robben, T.J.A.A., Strik, A.M., Kuil, C., Philipsen, R.L.A., van Duin, M., Conti, M. & Gossen, J.A. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 2993–2998.
- Fechner, S., Alvarez, L., Bönigk, W., Müller, A., Berger, T.K., Pascal, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Stölting, G., Siegfried, K.R., Kremmer, E., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 2015. A K⁺-selective CNG channel orchestrates Ca²⁺ signalling in zebrafish sperm. *eLife* **4**: 1–25.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D. & Lesage, F. 2015. The family of K^{2P} channels: salient structural and functional properties. *The Journal of Physiology* **593**: 2587–2603.

- Feliciangeli, S., Tardy, M.P., Sandoz, G., Chatelain, F.C., Warth, R., Barhanin, J., Bendahhou, S. & Lesage, F. 2010. Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 4798–4805.
- Flessner, L.B. & Moley, K.H. 2009. Similar [DE]XXXL[LI] motifs differentially target GLUT8 and GLUT12 in Chinese hamster ovary cells. *Traffic* **10**: 324–333.
- Frings, S., Brüll, N., Dzeja, C., Angele, A., Hagen, V., Kaupp, U.B. & Baumann, A. 1998. Characterization of *ether-à-go-go* channels present in photoreceptors reveals similarity to I_{KX} , a K^+ current in rod inner segments. *The Journal of General Physiology* **111**: 583–99.
- Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, E.J. & Darszon, A. 2000. Participation of a K^+ channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Developmental Biology* **221**: 285–294.
- Galindo, B.E., de la Vega-Beltrán, J.L., Labarca, P., Vacquier, V.D. & Darszon, A. 2007. Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K^+ channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**: 668–675.
- Galindo, B.E., Neill, A.T. & Vacquier, V.D. 2005. A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **334**: 96–101.
- Gatzogiannis, E., Chen, Z., Wei, L., Wombacher, R., Kao, Y.-T., Yefremov, G., Cornish, V.W. & Min, W. 2012. Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag. *Chemical Communications* **48**: 8694.
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U.B. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**: 583–7.
- Gianulis, E.C., Liu, Q. & Trudeau, M.C. 2013. Direct interaction of eag domains and cyclic nucleotide binding homology domains regulate deactivation gating in hERG channels. *The Journal of General Physiology* **142**: 351–66.
- Gianulis, E.C. & Trudeau, M. 2013. The hERG N-terminal eag domain directly interacts with the C-terminal cyclic nucleotide binding homology domain. *Biophysical Journal* **104**: 356a.
- Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M. a, Vischer, N.O.E., Jalink, K. & Gadella, T.W.J. 2010. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nature Methods* **7**: 137–9.
- Gonnelli, G., Rooman, M. & Dehouck, Y. 2012. Structure-based mutant stability predictions on proteins of unknown structure. *Journal of Biotechnology* **161**: 287–293.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Yoshiro Tatsu, Wood, C.D. & Darszon, A. 2010. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology* **344**: 52–65.

- Haitin, Y., Carlson, A.E. & Zagotta, W.N. 2013. The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature* **501**: 444–8.
- Han, K.-L. & Zhao, G.-J. 2011. Hydrogen bonding and transfer in the excited state. Wiley, Wiltshire, UK.
- Hansbrough, J.R. & Garbers, D.L. 1981. Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 2235–41.
- Harper, C. V., Barratt, C.L.R. & Publicover, S.J. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 46315–46325.
- Harper, S.M., Wienk, H., Wechselberger, R.W., Bos, J.L., Boelens, R. & Rehmann, H. 2008. Structural dynamics in the activation of Epac. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 6501–6508.
- Harzheim, D., Pfeiffer, K.H., Fabritz, L., Kremmer, E., Buch, T., Waisman, A., Kirchhof, P., Kaupp, U.B. & Seifert, R. 2008. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *The EMBO Journal* **27**: 692–703.
- He, Z., Gao, Y., Dong, J., Ke, Y., Li, X., Chen, Z. & Zhang, X.C. 2015. Crystal structure of cyclic nucleotide-binding-like protein from *Brucella abortus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **468**: 647–652.
- Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suarez, S.S., Levin, L.R., Williams, C.J., Buck, J. & Moss, S.B. 2005. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell* **9**: 249–59.
- Horlick, R.A., Macomber, J.L., Bowers, P.M., Neben, T.Y., Tomlinson, G.L., Krapf, I.P., Dalton, J.L., Verdino, P. & King, D.J. 2013. Simultaneous surface display and secretion of proteins from mammalian cells facilitate efficient in vitro selection and maturation of antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 19861–19869.
- Howarth, M., Takao, K., Hayashi, Y. & Ting, A.Y. 2005. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7583–8.
- Howarth, M., Wenhao Liu, Puthenveetil, S., Yi Zheng, Marshall, L.F., Schmidt, M.M., Wittrup, K.D., Bawendi, M.G. & Ting, A.Y. 2008. Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nature Methods* **5**: 397–399.
- Huang, G.Y., Kim, J.J., Reger, A.S., Lorenz, R., Moon, E.-W., Zhao, C., Casteel, D.E., Bertinetti, D., Vanschouwen, B., Selvaratnam, R., Pflugrath, J.W., Sankaran, B., Melacini, G., Herberg, F.W. & Kim, C. 2014. Structural basis for cyclic-nucleotide selectivity and cGMP-selective activation of PKG I. *Structure* **22**: 116–24.
- Hunter, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**: 113–27.

- Hyun Bae, J., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M.H.J., Azim, M.K., Kim, J., Zumbusch, A., Holak, T.A., Moroder, L., Huber, R. & Budisa, N. 2003. Expansion of the genetic code enables design of a novel “gold” class of green fluorescent proteins. *Journal of Molecular Biology* **328**: 1071–1081.
- Inouye, S. & Tsuji, F.I. 1994. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* **341**: 277–280.
- Isarankura-Na-Ayudhya, C., Tantimongcolwat, T., Galla, H.-J. & Prachayasittikul, V. 2010. Fluorescent protein-based optical biosensor for copper ion quantitation. *Biological Trace Element Research* **134**: 352–63.
- Johnson, D.R. & Wong, S.S. 1989. Conformational changes of type II regulatory subunit of cAMP- dependent protein kinase on cAMP binding. *FEBS Letters* **247**: 480–482.
- Johnson, K.F. & Kornfeld, S. 1992. The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *The Journal of Cell Biology* **119**: 249–257.
- Joyce, M.G., Levy, C., Gábor, K., Pop, S.M., Biehl, B.D., Doukov, T.I., Ryter, J.M., Mazon, H., Smidt, H., van den Heuvel, R.H.H., Ragsdale, S.W., van der Oost, J. & Leys, D. 2006. CprK crystal structures reveal mechanism for transcriptional control of halorespiration. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 28318–25.
- Jung, K., Park, J., Maeng, P. & Kim, H. 2005. Fluorescence quenching of green fluorescent protein during denaturation by guanidine. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **26**: 413–417.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Malester, B., Rindler, M.J., Rehmann, H., Bos, J.L., Schwede, F., Coetzee, W.A. & Holz, G.G. 2006. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic β cells and rat INS-1 cells. *The Journal of Physiology* **573**: 595–609.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Rindler, M.J., Collis, L., Chepurny, Z., Li, W.-H., Harbeck, M., Roe, M.W. & Holz, G.G. 2005. A cAMP and Ca^{2+} coincidence detector in support of Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in mouse pancreatic β cells. *The Journal of Physiology* **566**: 173–188.
- Kannan, N., Wu, J., Anand, G.S., Yooseph, S., Neuwald, A.F., Venter, J.C. & Taylor, S.S. 2007. Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome Biology* **8**: R264.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. & Graybiel, a M. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**: 2275–2279.
- Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D.E. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* **439**: 737–40.
- Kogure, T., Karasawa, S., Araki, T., Saito, K., Kinjo, M. & Miyawaki, A. 2006. A

- fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature Biotechnology* **24**: 577–581.
- Kornev, A.P., Taylor, S.S. & Ten Eyck, L.F. 2008. A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains. *PLoS Computational Biology* **4**: e1000056.
- Kosinski-Collins, M.S., Flaugh, S.L. & King, J. 2004. Probing folding and fluorescence quenching in human γ D crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins. *Protein Science* **13**: 2223–2235.
- Kraemer, A., Rehmann, H.R., Cool, R.H., Theiss, C., de Rooij, J., Bos, J.L. & Wittinghofer, A. 2001. Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *Journal of Molecular Biology* **306**: 1167–77.
- Krähling, A.M., Alvarez, L., Debowski, K., Van, Q., Gunkel, M., Irsen, S., Al-Amoudi, A., Strünker, T., Kremmer, E., Krause, E., Voigt, I., Wörtge, S., Waisman, A., Weyand, I., Seifert, R., Kaupp, U.B. & Wachten, D. 2013. CRIS- A novel cAMP binding protein controlling spermiogenesis and the development of flagellar bending. *PLoS Genetics* **9**: e1003960.
- Kuiperij, H.B., De Rooij, J., Rehmann, H., Van Triest, M., Wittinghofer, A., Bos, J.L. & Zwartkruis, F.J.T. 2003. Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1593**: 141–149.
- Kuiperij, H.B., Rehmann, H. & Zwartkruis, F.J.T. 2006. Biochemistry of the Rap-specific guanine nucleotide exchange factors PDZ-GEF1 and -2. *Methods in Enzymology* **407**: 174–86.
- Kumar, V.D. & Weber, I.T. 1992. Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel. *Biochemistry* **31**: 4643–4649.
- Kusch, J., Biskup, C., Thon, S., Schulz, E., Nache, V., Zimmer, T., Schwede, F. & Benndorf, K. 2010. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron* **67**: 75–85.
- Kusch, J., Thon, S., Schulz, E., Biskup, C., Nache, V., Zimmer, T., Seifert, R., Schwede, F. & Benndorf, K. 2011. How subunits cooperate in cAMP-induced activation of homotetrameric HCN2 channels. *Nature Chemical Biology* **8**: 162–169.
- Lakowicz, J.R. 2002. Topics in fluorescence spectroscopy- Principles. Kluwer Academic Publishers, New York, NY, USA.
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, NY, USA.
- Lanzilotta, W.N., Schuller, D.J., Thorsteinsson, M. V, Kerby, R.L., Roberts, G.P. & Poulos, T.L. 2000. Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nature Structural Biology* **7**: 876–80.

- Lee, H.C. & Garbers, D.L. 1986. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *The Journal of Biological Chemistry* **261**: 16026–32.
- Lee, H.J., Lang, P.T., Fortune, S.M., Sasseti, C.M. & Alber, T. 2012. Cyclic AMP regulation of protein lysine acetylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 811–818.
- Levine, N. & Marsh, D.J. 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *The Journal of Physiology* **213**: 557–570.
- Levy, C., Pike, K., Heyes, D.J., Joyce, M.G., Gabor, K., Smidt, H., Van Der Oost, J. & Leys, D. 2008. Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Molecular Microbiology* **70**: 151–167.
- Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Zhai, Y. & Wang, Q. 2010. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology* **9**: 8549–8554.
- Lin-Chao, S., Chen, W.T. & Wong, T.T. 1992. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology* **6**: 3385–3393.
- Liu, Y., Wang, D.-K. & Chen, L.-M. 2012. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biology of Reproduction* **86**: 99–99.
- Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L.A., Marquardt, A., Stühmer, W. & Pongs, O. 1994. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated *ether á go-go* potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *The EMBO Journal* **13**: 4451–8.
- Maas, D.H., Storey, B.T. & Mastroianni, L. 1977. Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertility and Sterility* **28**: 981–5.
- Mao, H., Song, J., Liang, C., Yu, Z. & Chen, X. 2006. Construction of eukaryotic surface display based on the baculoviral F protein. *BioTechniques* **41**: 266–272.
- Marques-Carvalho, M.J. & Morais-Cabral, J.H. 2012. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a cyclic nucleotide-binding homology domain from the mouse EAG potassium channel. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* **68**: 337–9.
- Marques-Carvalho, M.J., Sahoo, N., Muskett, F.W., Vieira-Pires, R.S., Gabant, G., Cadene, M., Schönherr, R. & Morais-Cabral, J.H. 2012. Structural, biochemical, and functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel. *Journal of Molecular Biology* **423**: 34–46.

- Marvin, J.S., Borghuis, B.G., Tian, L., Cichon, J., Harnett, M.T., Akerboom, J., Gordus, A., Renninger, S.L., Chen, T.-W., Bargmann, C.I., Orger, M.B., Schreiter, E.R., Demb, J.B., Gan, W.-B., Hires, S.A. & Looger, L.L. 2013. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nature Methods* **10**: 162–70.
- McKay, D.B. & Steitz, T.A. 1981. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744–9.
- Medintz, I. & Hildebrandt, N. 2013. FRET - Förster resonance energy transfer. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Meech, S.R. 2009. Excited state reactions in fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews* **38**: 2922–34.
- Miki, K. & Clapham, D.E. 2013. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology* **23**: 443–52.
- Mohanty, S., Kennedy, E.J., Herberg, F.W., Hui, R., Taylor, S.S., Langsley, G. & Kannan, N. 2015. Structural and evolutionary divergence of cyclic nucleotide binding domains in eukaryotic pathogens: Implications for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta* **1854**: 1575–1585.
- Monroy, E. 2016. Caracterización espectroscópica de proteínas quiméricas construidas a partir de una proteína fluorescente y de un dominio de unión a nucleótidos cíclicos. Un intento para desarrollar un nuevo sensor fluorescente para el AMPc.
- Nambi, S., Basu, N. & Visweswariah, S.S. 2010. cAMP-regulated protein lysine acetylases in mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 24313–23.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2008. Lehninger. Principles of biochemistry. W. H. Freeman & company, New York, NY.
- Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M.J. 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 37215–8.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L. & Darszon, A. 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**: 1149–1158.
- Nishigaki, T. & Treviño, C.L. 2012. Study of protein-protein interactions by fluorescence spectroscopy. In: *Tools to understand protein-protein interactions* (I. Gómez, ed). Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 87–100.
- Nomura, M., Beltrán, C., Darszon, A. & Vacquier, V.D. 2005. A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene* **353**: 231–238.
- Nomura, M. & Vacquier, V.D. 2006. Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**: 582–90.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*

273: 1392–1395.

- Peuker, S., Cukkemane, A., Held, M., Noé, F., Kaupp, U.B. & Seifert, R. 2013. Kinetics of ligand-receptor interaction reveals an induced-fit mode of binding in a cyclic nucleotide-activated protein. *Biophysical Journal* **104**: 63–74.
- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., De Hoog, C.L., Moran, M.F. & Rotin, D. 2000. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Current Biology* **10**: 555–558.
- Piatkevich, K.D., Hulit, J., Subach, O.M., Wu, B., Abdulla, A., Segall, J.E. & Verkhusha, V. V. 2010. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 5369–5374.
- Piston, D.W. & Kremers, G.-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **32**: 407–14.
- Popovych, N., Tzeng, S.R., Tonelli, M., Ebright, R.H. & Kalodimos, C.G. 2009. Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6927–32.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229–233.
- Qiao, J., Mei, F.C., Popov, V.L., Vergara, L. a & Cheng, X. 2002. Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 26581–6.
- Redmond, R.W., Kochevar, I.E., Krieg, M., Smith, G. & McGimpsey, W.G. 1997. Excited state relaxation in cyanine dyes: A remarkably efficient reverse intersystem crossing from upper triplet levels. *The Journal of Physical Chemistry A* **101**: 2773–2777.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2006. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**: 625–628.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J.L. & Wittinghofer, A. 2003. Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nature Structural Biology* **10**: 26–32.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2007. Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 63–73.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, a C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L. & Clapham, D.E. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**: 603–609.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B. & Piston, D.W. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology* **22**: 445–9.

- Robertson, G.A., Warmke, J.M. & Ganetzky, B. 1996. Potassium currents expressed from *Drosophila* and mouse *eag* cDNAs in *Xenopus oocytes*. *Neuropharmacology* **35**: 841–50.
- Roy, R., Hohng, S. & Ha, T. 2008. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods* **5**: 507–516.
- Sahyun, M.R. V. & Serpone, N. 1997. Photophysics of thiocarbocyanine dyes: Relaxation dynamics in a homologous series of thiocarbocyanines. *The Journal of Physical Chemistry A* **101**: 9877–9883.
- Sample, V., Newman, R.H. & Zhang, J. 2009. The structure and function of fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews* **38**: 2852–64.
- Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. & Keating, M.T. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**: 299–307.
- Schünke, S. & Stoldt, M. 2013. Structural snapshot of cyclic nucleotide binding domains from cyclic nucleotide-sensitive ion channels. *Biological Chemistry* **394**: 1439–1451.
- Seward, H.E. & Bagshaw, C.R. 2009. The photochemistry of fluorescent proteins: implications for their biological applications. *Chemical Society Reviews* **38**: 2842–51.
- Shabb, J.B. & Corbin, J.D. 1992. Cyclic nucleotide binding domains in proteins having diverse functions. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 5723–5726.
- Shcherbakova, D.M., Hink, M.A., Joosen, L., Gadella, T.W.J. & Verkhusha, V. V. 2012. An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 7913–23.
- Shelver, D., Kerby, R.L., He, Y. & Roberts, G.P. 1997. CooA, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum*, is a CO-binding heme protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11216–20.
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E. & Perrais, D. 2014. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *Journal of Cell Biology* **207**: 419–432.
- Shimomura, O. 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters* **104**: 220–222.
- Simrick, S., Schindler, R.F., Poon, K.-L. & Brand, T. 2013. Popeye domain-containing proteins and stress-mediated modulation of cardiac pacemaking. *Trends in Cardiovascular Medicine* **23**: 257–63.
- Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J.E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E. & Kaupp, U.B. 2006. A K^+ -selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nature Cell Biology* **8**: 1149–1154.

- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113–30.
- Su, Y.-H., Chen, S.-H., Zhou, H. & Vacquier, V.D. 2005. Tandem mass spectrometry identifies proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase when sea urchin sperm undergo the acrosome reaction. *Developmental Biology* **285**: 116–25.
- Tsalkova, T., Mei, F.C. & Cheng, X. 2012. A fluorescence-based high-throughput assay for the discovery of exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) antagonists. *PLoS One* **7**: e30441.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509–44.
- van Bloois, E., Winter, R.T., Kolmar, H. & Fraaije, M.W. 2011. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **29**: 79–86.
- Vergarajauregui, S. & Puertollano, R. 2006. Two di-leucine motifs regulate trafficking of mucopolin-1 to lysosomes. *Traffic* **7**: 337–53.
- Vogel, S.S., Nguyen, T.A., van der Meer, B.W. & Blank, P.S. 2012. The Impact of Heterogeneity and Dark Acceptor States on FRET: Implications for Using Fluorescent Protein Donors and Acceptors. *PLoS ONE* **7**: e49593.
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I.A., Quill, T. a, McLeroy, P., Moe, O.W. & Garbers, D.L. 2007. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and *in vivo* bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 9325–30.
- Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K. & Garbers, D.L. 2003. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology* **5**: 1117–1122.
- Weber, I.T., Shabb, J.B. & Corbin, J.D. 1989. Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* **28**: 6122–6127.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. 1987. Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**: 343–51.
- Widengren, J. & Schwille, P. 2000. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A* **104**: 6416–6428.
- Wiedemann, C., Bellstedt, P. & Grolach, M. 2013. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics* **29**: 1750–1757.

- Won, H.S., Lee, Y.S., Lee, S.H. & Lee, B.J. 2009. Structural overview on the allosteric activation of cAMP receptor protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1794**: 1299–1308.
- Wood, C.D., Nishigaki, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., Baba, S. a, Whitaker, M. & Darszon, A. 2007. Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental Biology* **306**: 525–37.
- Yang, F., Moss, L.G. & Phillips, G.N. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**: 1246–1251.
- Yang, J., Zhang, Z., Lin, J., Lu, J., Liu, B., Zeng, S. & Luo, Q. 2007. Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**: 400–7.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R. & Gouaux, E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**: 200–205.
- Zapata-Hommer, O. & Griesbeck, O. 2003. Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnology* **3**: 5.
- Zhang, J., Zhang, X., Liu, Q., Li, M., Gao, L., Gao, X., Xiang, S., Wu, L., Fu, J. & Song, H. 2014. Mammalian cell display for rapid screening scFv antibody therapy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **46**: 859–66.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L. 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* **32**: e115.
- Zhong, Y. & Wu, C.F. 1993. Modulation of different K⁺ currents in *Drosophila*: A hypothetical role for the Eag subunit in multimeric K⁺ channels. *The Journal of Neuroscience* **13**: 4669–4679.

12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

12. 1. Materiales

12. 1. 1. Medios y soluciones

- Medio lisogénico líquido (LB líquido): También conocido como Luria-Bertani. 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada, posteriormente se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza por autoclave.
- Medio LB sólido: 15 g de agar disueltos en 1 L de medio LB líquido.
- Medio ADMEM suplementado: Medio Eagle modificado de Dulbecco avanzado (ADMEM por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos 1 % (estreptomicina y penicilina) y suero fetal bovino 10 % (FBS por sus siglas en inglés; Gibco, Invitrogen).
- Antibióticos para biología molecular:

	Concentración de stock	Concentración de trabajo
Ampicilina	100 mg/mL	100 µg/mL
Kanamicina	50 mg/mL	50 µg/mL

- Amortiguador TAE 50 X: EDTA 100 mM, Tris base 2 M, ácido acético glacial 1 M, pH 8.5.
- Amortiguador de carga para gel de agarosa 6 X: Glicerol 30%, EDTA 60 mM, azul de bromofenol 0.03%, Tris-HCl 20 mM.
- Solución de CaCl₂ para la preparación de células competentes: CaCl₂ 75 mM y 15% de glicerol, se esteriliza por autoclave.
- Solución de lavado para purificación de proteína: Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, pH 7.4.
- Solución de sonicación para purificación de proteína: Tris-HCl 10mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.
- Solución para equilibrar la columna de níquel (S1): Tris HCl 10mM, NaCl 300 mM, pH 7.4.

- Solución de lavado para purificación de proteínas (S2): Tris HCl 10mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, pH 7.4.
- Solución de elución para purificación de proteínas (S3): Tris HCl 10mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 7.4.
- Solución para dializar proteína: Tris HCl 10 mM, pH 7.4.
- Amortiguador de carga de proteínas 3 X: SDS 10%, glicerol 40%, EDTA 3 mM, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.03%.
- Amortiguador pH 8.8 para gel separador de poliacrilamida: 1.5 M Tris-HCl, 8 mM Na₂EDTA, 0.4% SDS.
- Amortiguador pH 6.8 para gel condensador de poliacrilamida: 0.5 M Tris-HCl, 5 mM Na₂EDTA, 0.4% SDS.
- Gel condensador al 4.5 % de acrilamida: 1 mL del amortiguador para gel condensador de poliacrilamida pH 6.8, 0.6 mL de la solución acrilamida-bisacrilamida, 2.5 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED), 37.5 μ L de APS, se afora con agua hasta 4 mL.
- Gel separador al 10 % de acrilamida total: 2.5 mL de buffer pH 8.8 para gel separador de poliacrilamida, 3.3 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida, 6 μ L de TEMED, 120 μ L de APS.
- Solución de acrilamida: Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8%
- Solución de Coomassie para teñir geles: 0.5% azul de Coomassie, 50% metanol, 5% ácido acético.
- Solución para desteñir geles: 20% metanol, 7.5 % ácido acético.

12. 1. 2. Enzimas

- Enzimas de restricción (Thermo Scientific)

DpnI

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador Tango	10 X	3 μ L	1 X
DNA	500-1,000 ng	x μ L	~30 ng/ μ L
Enzima DpnI	10 U/ μ L	2 μ L	0.6 U/ μ L
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 30 μ L	

BamHI-HindIII

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador BamHI	10 X	3 μ L	1 X
DNA	500-1,000 ng	x μ L	~30 ng/ μ L
Enzima BamHI	10 U/ μ L	2 μ L	0.4 U/ μ L
Enzima HindIII	10 U/ μ L	4 μ L	0.8 U/ μ L
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 50 μ L	

NheI-BamHI

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador Tango	10 X	3 μ L	1 X
DNA	500-1,000 ng	x μ L	~30 ng/ μ L
Enzima NheI	10 U/ μ L	2 μ L	0.4 U/ μ L
Enzima BamHI	10 U/ μ L	2 μ L	0.4 U/ μ L
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 50 μ L	

NheI-SacII

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador B	10 X	3 μ L	1 X
DNA	500-1,000 ng	x μ L	~30 ng/ μ L
Enzima NheI	10 U/ μ L	2 μ L	0.4 U/ μ L
Enzima SacII	10 U/ μ L	2 μ L	0.4 U/ μ L
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 50 μ L	

HindIII-XhoI

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador R	10 X	3 µL	1 X
DNA	500-1,000 ng	x µL	~30 ng/µL
Enzima HindIII	10 U/µL	2 µL	0.4 U/µL
Enzima XhoI	10 U/µL	2 µL	0.4 U/µL
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 50 µL	

• Enzima ligasa del fago T4 (Thermo Scientific)

	Stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador para ligasa	10 X	3 µL	1 X
Vector	30 fmoles	x µL	1 fmol/µL
Inserto	150 fmoles	x µL	5 fmol/µL
Ligasa T4	5 U/µL	2 µL	0.3 U/µL
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a 30 µL	

• DNA polimerasa Vent (New England Biolabs)*Mezcla de reacción*

	Concentración del stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador ThermoPol	10 X	5 µL	1 X
Desoxinucleótidos (dNTPs)	10 mM	1 µL	200 µM
Oligonucleótido 5'	3 µM	5 µL	300 nM
Oligonucleótido 3'	3 µM	5 µL	300 nM
DNA (templado)	~30 ng/µL	1 µL	0.6 ng/µL
DNA polimerasa Vent	2 U/µL	0.8 µL	0.03 U/µL
MgSO ₄	100 mM	1.5 µL	3 mM
H ₂ O libre de nucleasas		Aforar a un volumen final de 50 µL	

Condiciones del protocolo de PCR

	Paso	Temperatura	Tiempo
30 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
	Desnaturalización	95 °C	30 s
	Alineamiento	T _m	30 s
	Extensión	72 °C	60 s/kb
	Extensión final	72 °C	5 min
	Mantenimiento	4 °C	∞

- DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific)

Mezcla de reacción

	Concentración del stock	Volumen	Concentración final
Amortiguador Phusion HF o GC	5 X	10 µL	1 X
dNTPs	10 mM	1 µL	200 µM
Oligonucleótido 5'	3 µM	5 µL	300 nM
Oligonucleótido 3'	3 µM	5 µL	300 nM
DNA (templado)	~30 ng/µL	1 µL	0.6 ng/µL
DNA polimerasa Phusion	2 U/µL	0.8 µL	0.03 U/µL
H ₂ O libre de nucleasas	Aforar a un volumen final de 50 µL		

Condiciones del protocolo de PCR

	Paso	Temperatura	Tiempo
30 ciclos (PCR usual) o 18 ciclos (mutaciones)	Desnaturalización inicial	98 °C	5 min
	Desnaturalización	98 °C	30 s
	Alineamiento	55 °C	30 s
	Extensión	72 °C	30 s/kb
	Extensión final	72 °C	10 min
	Mantenimiento	4 °C	∞

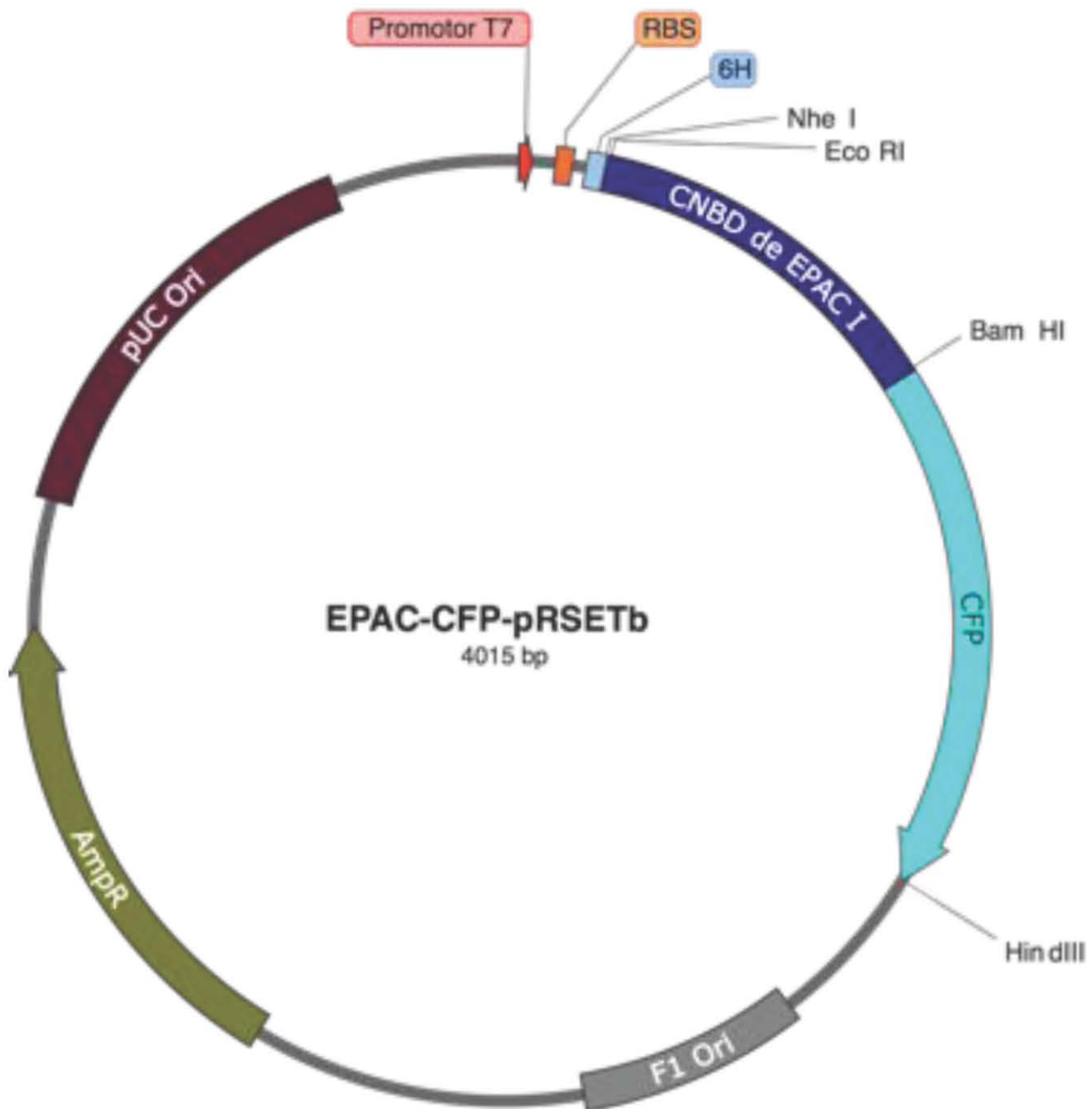
12. 1. 3. Oligonucleótidos

	Función	Secuencia (5'→3')
Tak 090R	Agrega el sitio de restricción HindIII al extremo 3' de las proteínas fluorescentes	GGA AGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G
Tak 103F	Agrega el sitio de restricción NheI al extremo 5' de EPAC-mAmetrine 1.2	GGC TAG CGA ATT CGA GGA GTT GGC C
Tak 178F	Agrega el sitio de restricción BamHI al extremo 5' de las FPs	CCC GGA TCC GAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G
Tak 194F	Agrega el sitio de restricción SacII al vector pDisplay	GTC CCG CGG GGT GGT GGT AGC GGC GGT GGC CTG CAG GTC GAC GAA CA
Tak 197R	Agrega el sitio de restricción SacII al extremo 3' de EPAC-Ametrine 1.2	CCC CCG CGG CTT GTA CAG CTC GTC CAT G
Tak 225F	Cebador directo para la mutación de R279E en el PBC del CNBD de EPAC I	GCA CCC GAA GCA GCC ACC ATC ATC
Tak 226R	Cebador reverso para la mutación de R279E en el PBC del CNBD de EPAC I	GGC TGC TTC GGG TGC GTC ATT CA
Tak 291R	Agrega el sitio de restricción NheI al vector pDisplay	GCC GCT AGC AGC AGG TTG GGC CCC AGC ATA ATC

12. 1. 4. Plásmidos

Nombre	Resistencia	Construido por
EPAC-CFP-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
mAmetrine-pRESTb	Amp ^r	M. en C. Yoloxóchitl Sánchez-Guevara
pBAD-mAmetrine 1.2	Amp ^r	Dr. Robert Campbell (Addgene #42171)
pDisplay-CFP	Amp ^r	Dra. Alice Ting (Addgene #20861)
EPAC-mAmetrine-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
EPAC-mAmetrine 1.2-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
EPAC _{R279E} -mAmetrine1.2 pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
mCherry-stop-mAmetrine 1.2-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
pDisplay-EPAC-mAmetrine 1.2	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
pDisplay-EPAC _{R279E} -mAmetrine 1.2	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo

• EPAC-CFP-pRSETb



	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6His	112..136
CNBD de EPAC I	137..642
CFP	643..1362
T7 terminator	1430..1477
LacZ alpha	1504..1572
F1 Ori	1591..1897
AmpR promoter	2055..2159
AmpR	2160..3020
pUC Ori	3191..3779

- mAmetrine-pRSETb

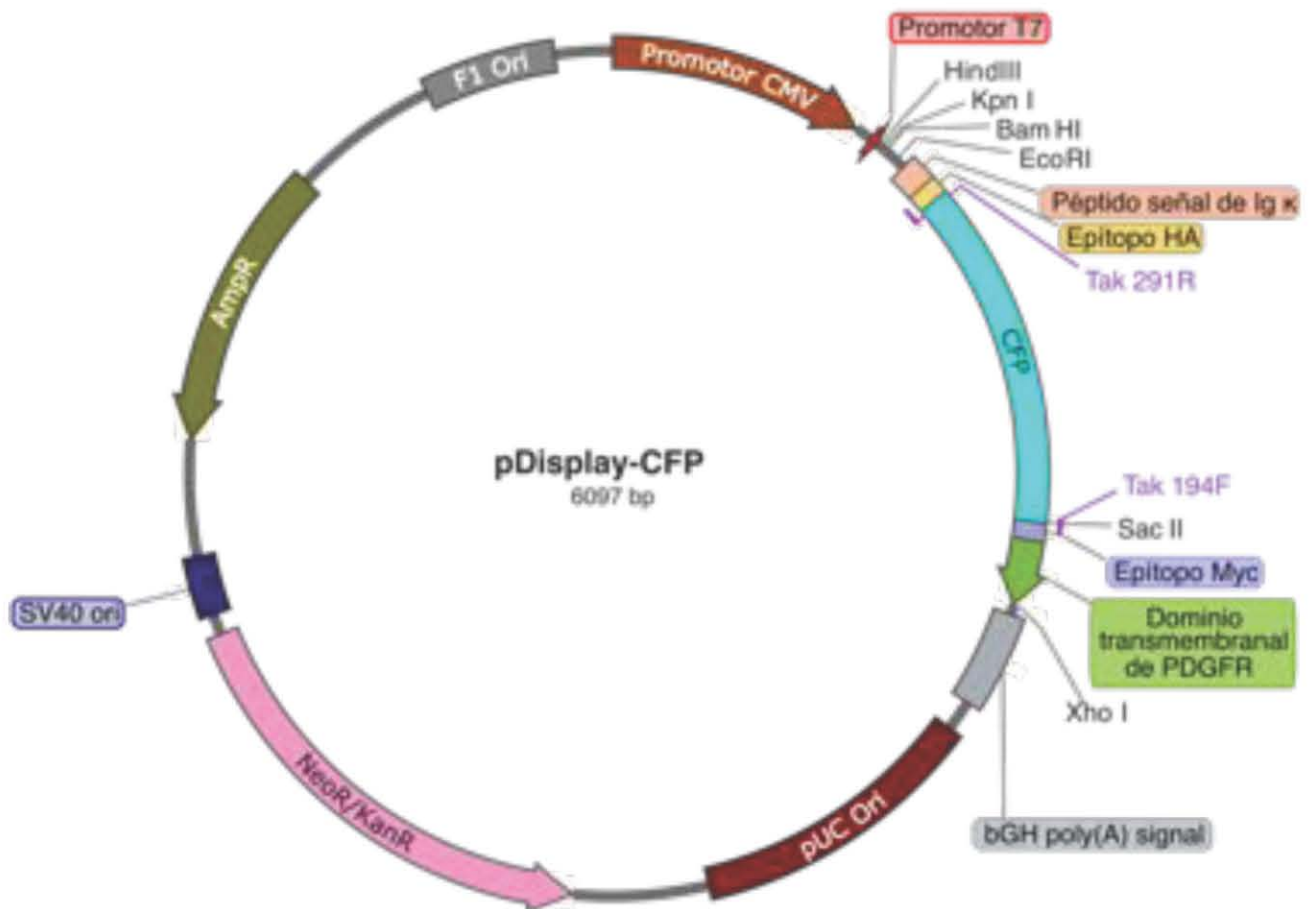


• pBAD-mAmetrine 1.2



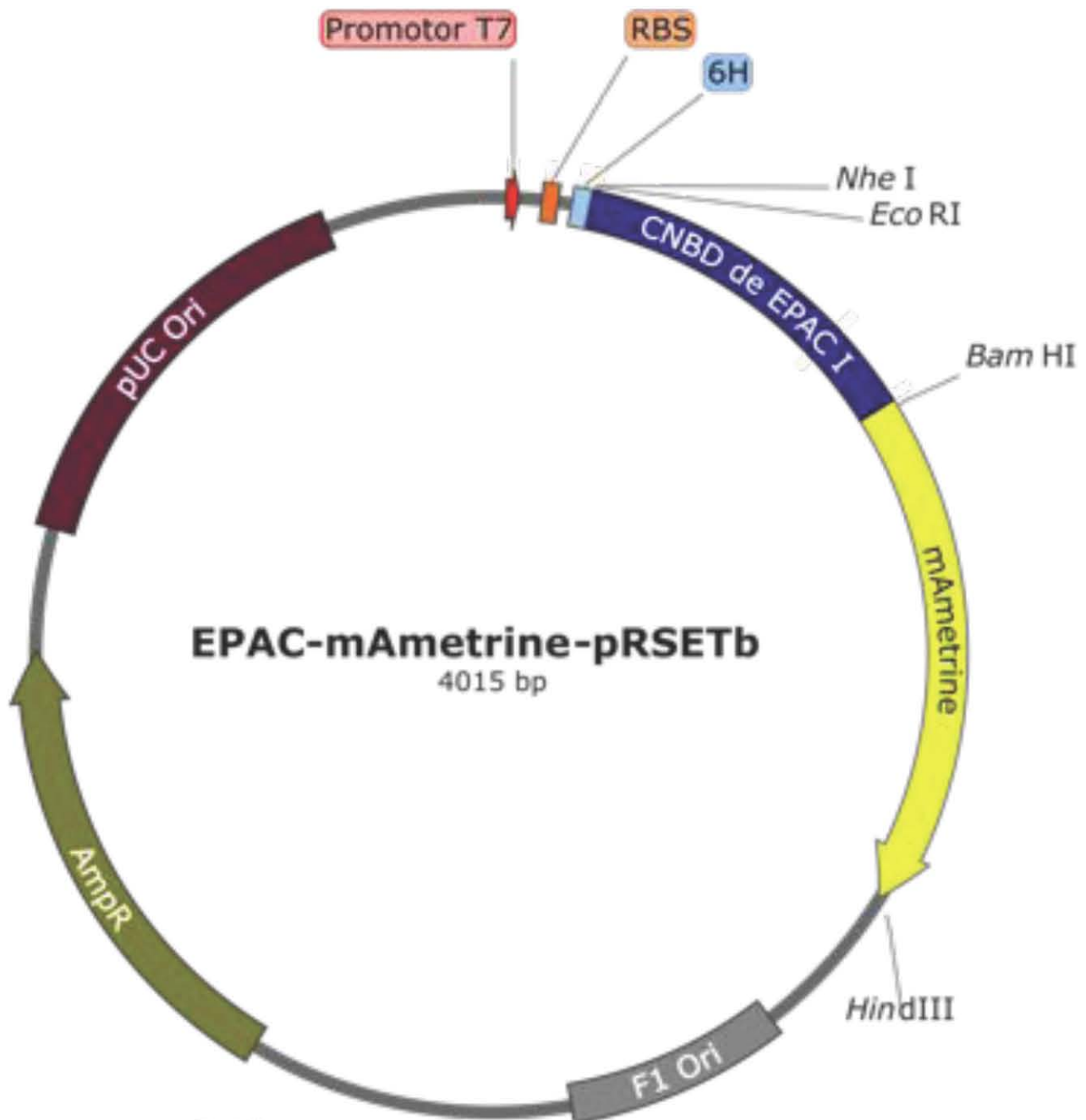
	Posición
Promotor araBAD	1..285
6His tag	331..355
T7 tag (gene 10 leader)	352..384
Xpress tag	388..411
mAmetrine 1.2	427..1146
rrnB T1 terminator	1362..1448
rrnB T2 terminator	1540..1567
AmpR promoter	1586..1677
AmpR	1747..2538
pUC Ori	2683..3356
bom	3483..3623
araC	3887..4765

• pDisplay-CFP



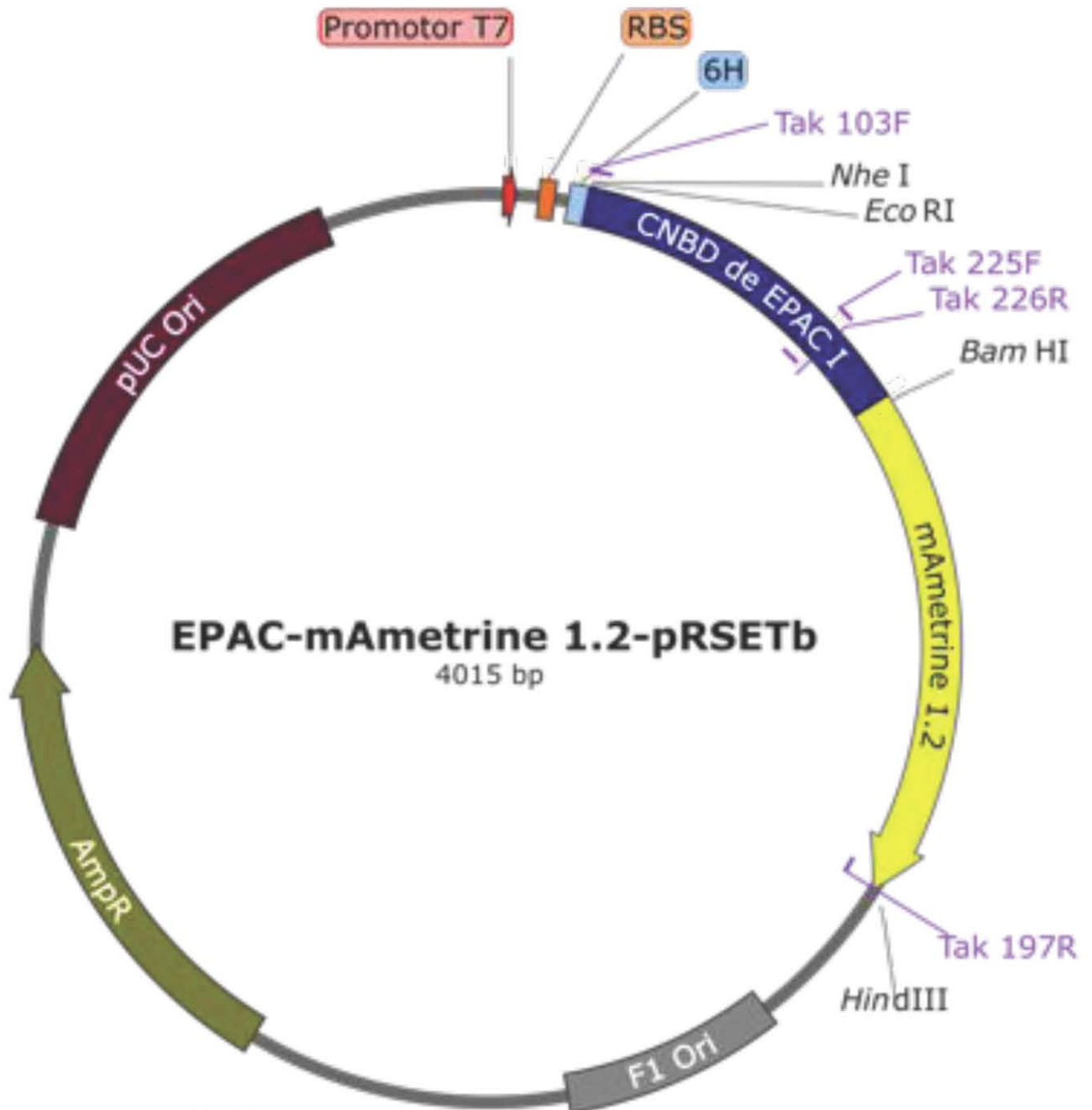
	Posición
Promotor CMV	1..596
CMV enhancer	10..389
Promotor T7	638..656
Péptido señal de Ig-kappa	737..799
Epitopo HA	800..841
CFP	845..1633
Epitopo Myc	1634..1675
Dominio transmembranal de PDGFR	1676..1828
bGH poly(A) signal	1853..2077
pUC Ori	2150..2823
HSV TK poly(A) signal	3126..3173
NeoR/KanR	3138..4193
SV40 promoter	4228..4588
SV40 ori	4242..4380
AmpR	4651..5310
AmpR promoter	5509..5613
F1 Ori	5657..5963

- EPAC-mAmetrine-pRSETb



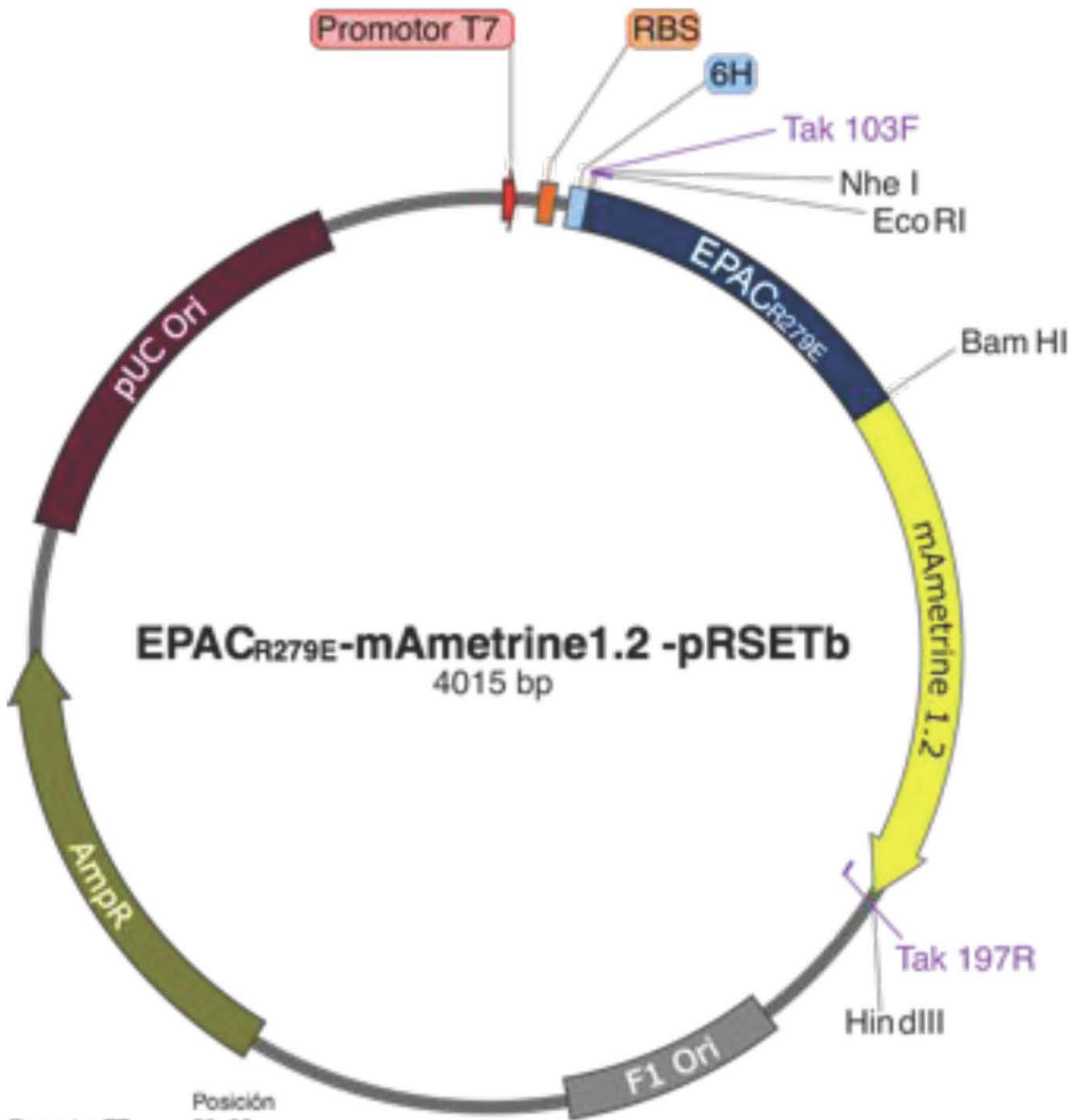
	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6H	112..136
CNBD de EPAC I	37..642
mAmetrine	643..1362
T7 terminator	1430..1477
LacZ alpha	1504..1572
F1 Ori	1591..1897
AmpR promoter	2055..2159
AmpR	2358..3017
ColE1 origin	3115..3797
pUC Ori	3191..3779

• EPAC-mAmetrine 1.2-pRSETb



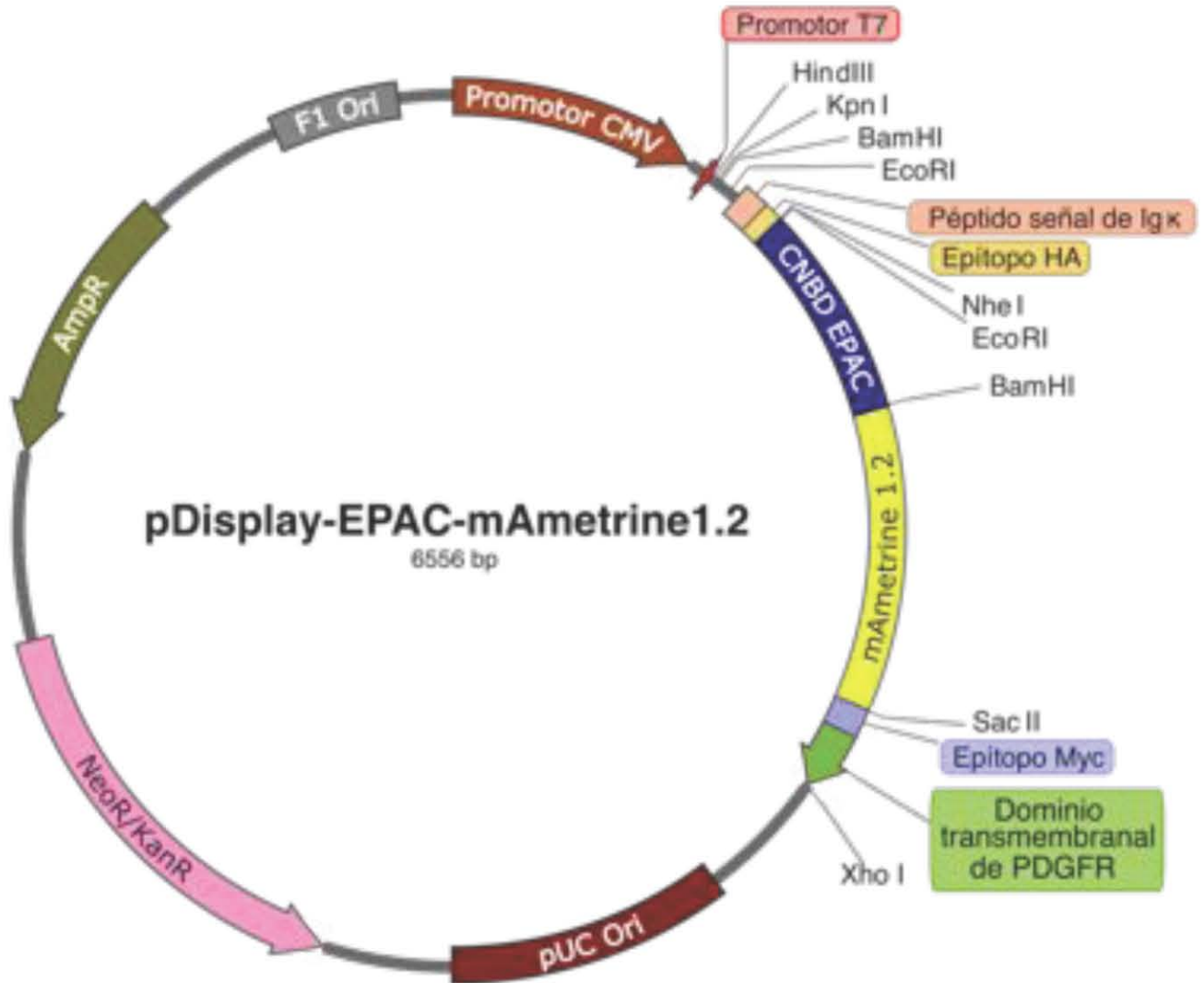
	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6H	112..136
CNBD de EPAC I	137..642
mAmetrine 1.2	643..1362
T7 terminator	1430..1477
LacZ alpha	1504..1572
F1 Ori	1591..1897
AmpR promoter	2055..2159
AmpR	2358..3017
ColE1 origin	3115..3797
pUC Ori	3191..3779

- EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2 pRSETb



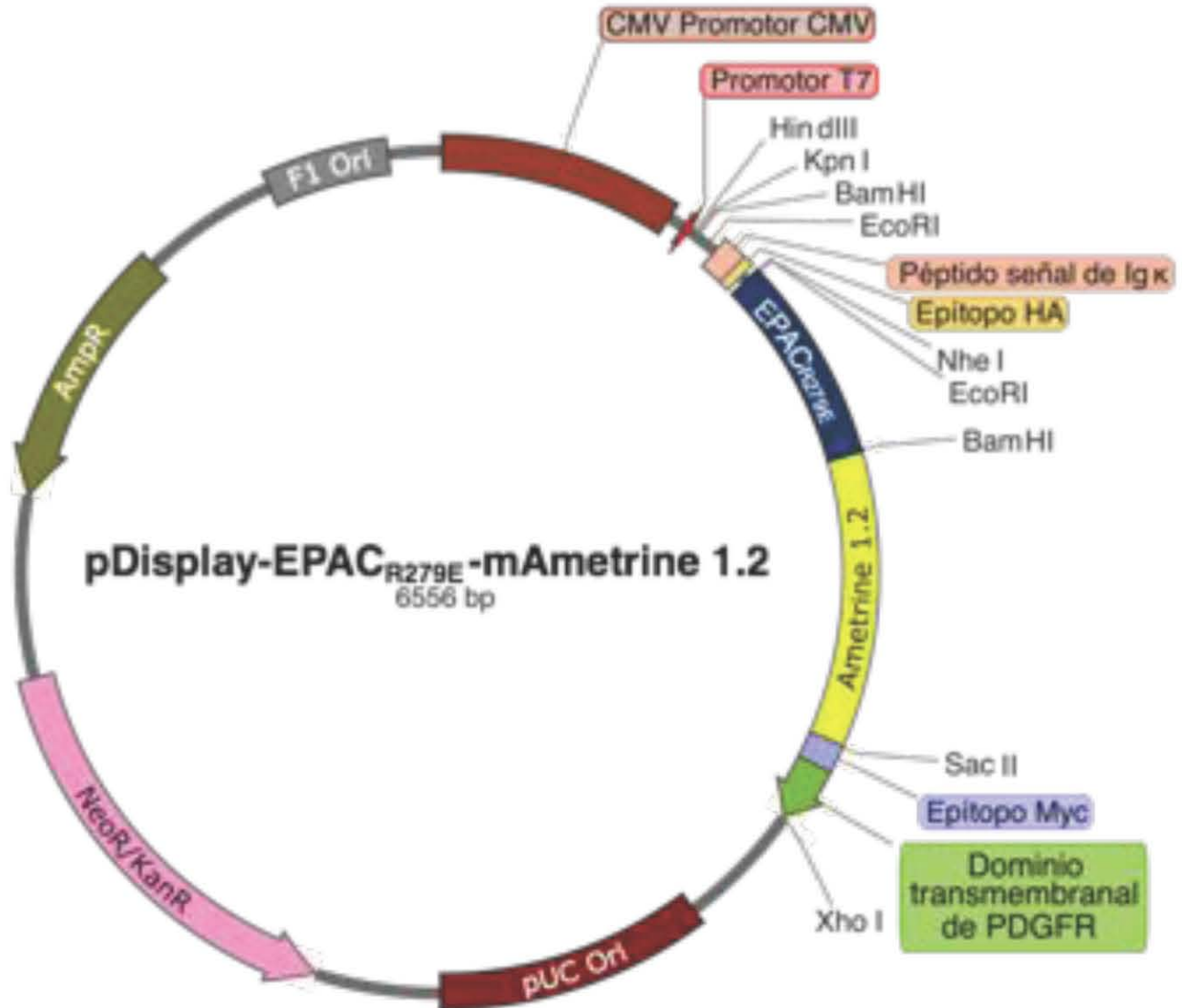
Element	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6H	112..136
EPAC R279E	137..642
mAmetrine 1.2	643..1362
T7 terminator	1430..1477
LacZ alpha	1504..1572
F1 Ori	1591..1897
AmpR promoter	2055..2159
AmpR	2358..3017
ColE1 origin	3115..3797
pUC Ori	3191..3779

• pDisplay-EPAC-mAmetrine 1.2



	Posición
Promotor CMV	1..596
CMV enhancer	10..389
Promotor T7	638..656
Péptido señal de Ig-kappa	737..799
Epitopo HA	800..842
CNBD EPAC	843..1348
mAmetrine 1.2	1349..2065
Epitopo Myc	2066..2134
Dominio TM de PDGFR	2135..2287
bGH poly(A) signal	2312..2536
pUC Ori	2609..3282
NeoR/KanR	3597..4652
SV40 promoter	4687..5047
SV40 ori	4701..4839
AmpR	5110..5769
AmpR promoter	5968..6072
F1 Ori	6116..6422

• pDisplay-EPAC_{R279E}-mAmetrine 1.2



	Posición
Promotor CMV	1..586
CMV enhancer	10..389
Promotor T7	638..656
Peptido señal de Ig-kappa	737..799
Epitopo HA	800..842
CNBD EPAC RΔE	843..1348
mAmetrine 1.2	1349..2065
Epitopo Myc	2066..2134
Dominio TM de PDGFR	2135..2287
bGH poly(A) signal	2312..2536
pUC Ori	2609..3282
NeoR/KanR	3597..4852
SV40 promotor	4687..5047
SV40 ori	4701..4839
AmpR	5110..5769
AmpR promotor	5968..6072
F1 Ori	6116..6422

12. 2. Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Preparación del plásmido EPAC-mAmetrine-pRSETb.	134
Figura suplementaria 2. Preparación del plásmido EPAC-mAmetrine1.2-pRSETb .	135
Figura suplementaria 3. Espectros de fluorescencia de EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPc.	136
Figura suplementaria 4. Preparación del plásmido EPAC _{R279E} -mAmetrine1.2-pRSET	137
Figura suplementaria 5. Preparación del plásmido pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2.	138
Figura suplementaria 6. Construcción de pDisplay-EPAC _{R279E} -mAmetrine1.2.....	139
Figura suplementaria 7. Prueba piloto del ensayo de unión en células CHO transfectadas con pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2	140
Figura suplementaria 8. Apagamiento de la fluorescencia de EPAC-mAmetrine1.2 y EPAC-CFP por Cu ²⁺	141

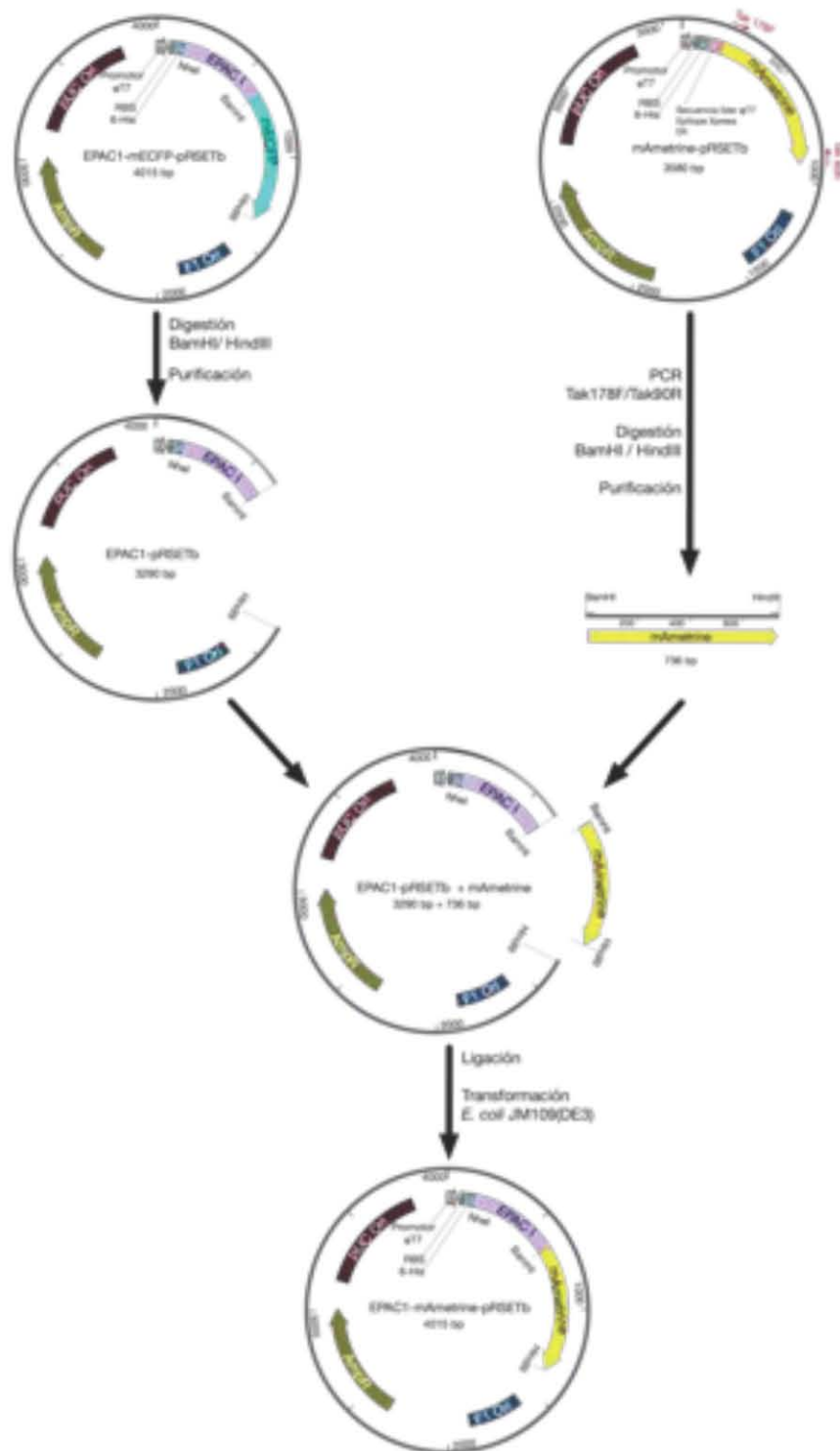


Figura suplementaria 1. Preparación del plásmido EPAC-mAmetrine-pRSETb.

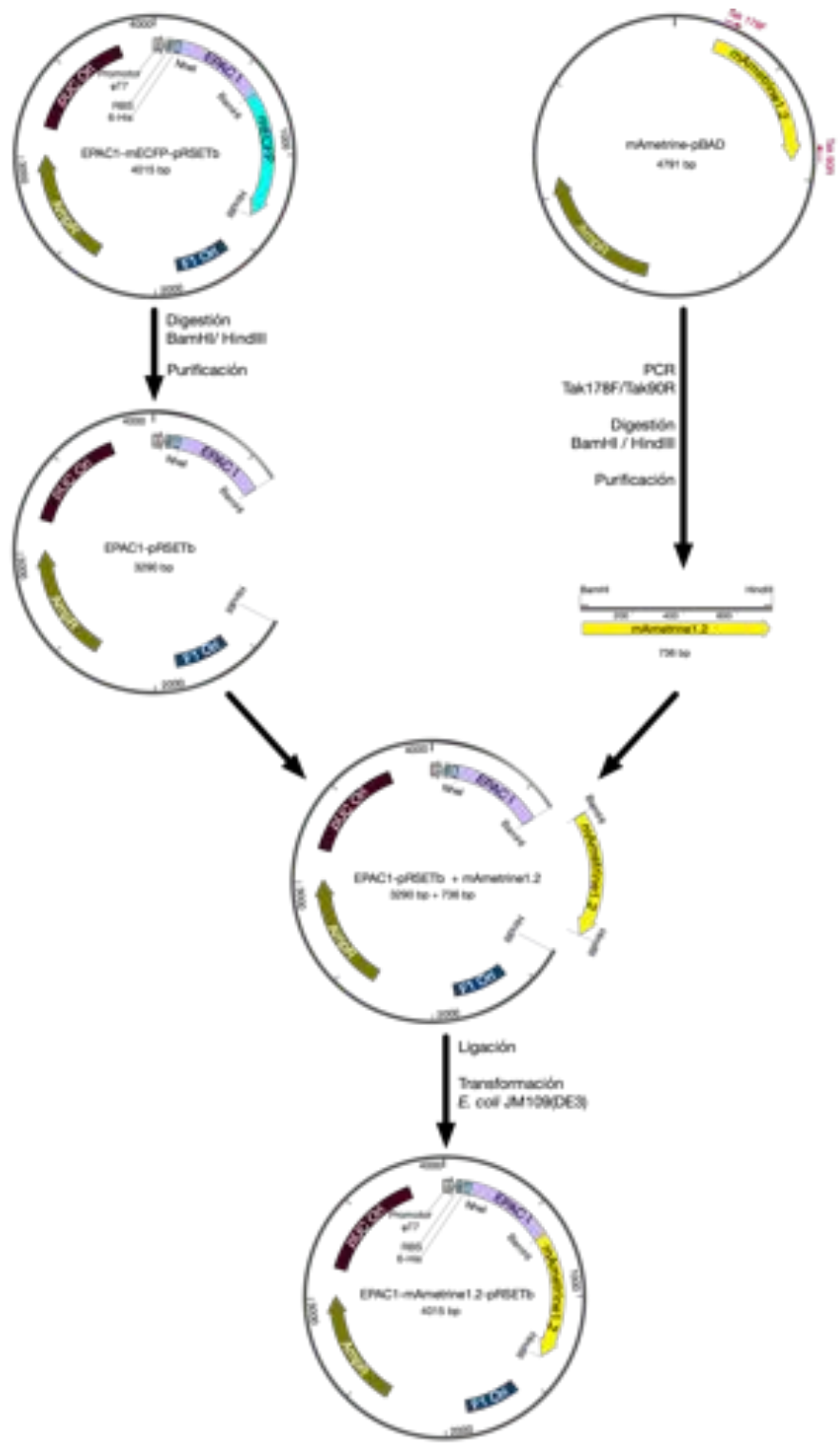


Figura suplementaria 2. Preparación del plásmido EPAC-mAmetrine1.2-pRSETb

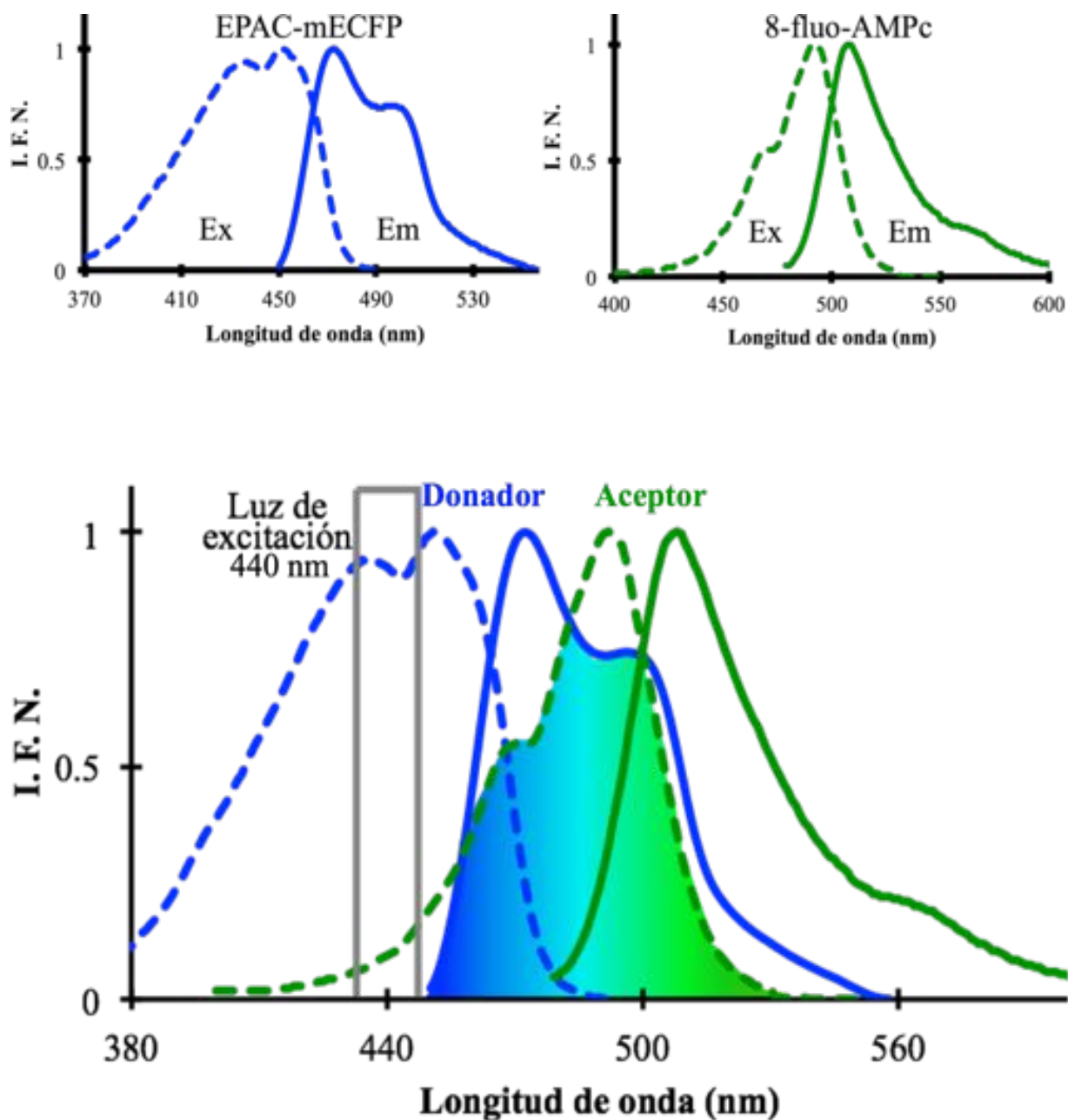


Figura suplementaria 3. Espectros de fluorescencia de EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPC.

En la parte de arriba se muestran los espectros de excitación (línea discontinua) y de emisión (línea sólida) de EPAC-CFP y 8-[Fluo]-AMPC. En el panel de abajo se muestra la sobreposición del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor.

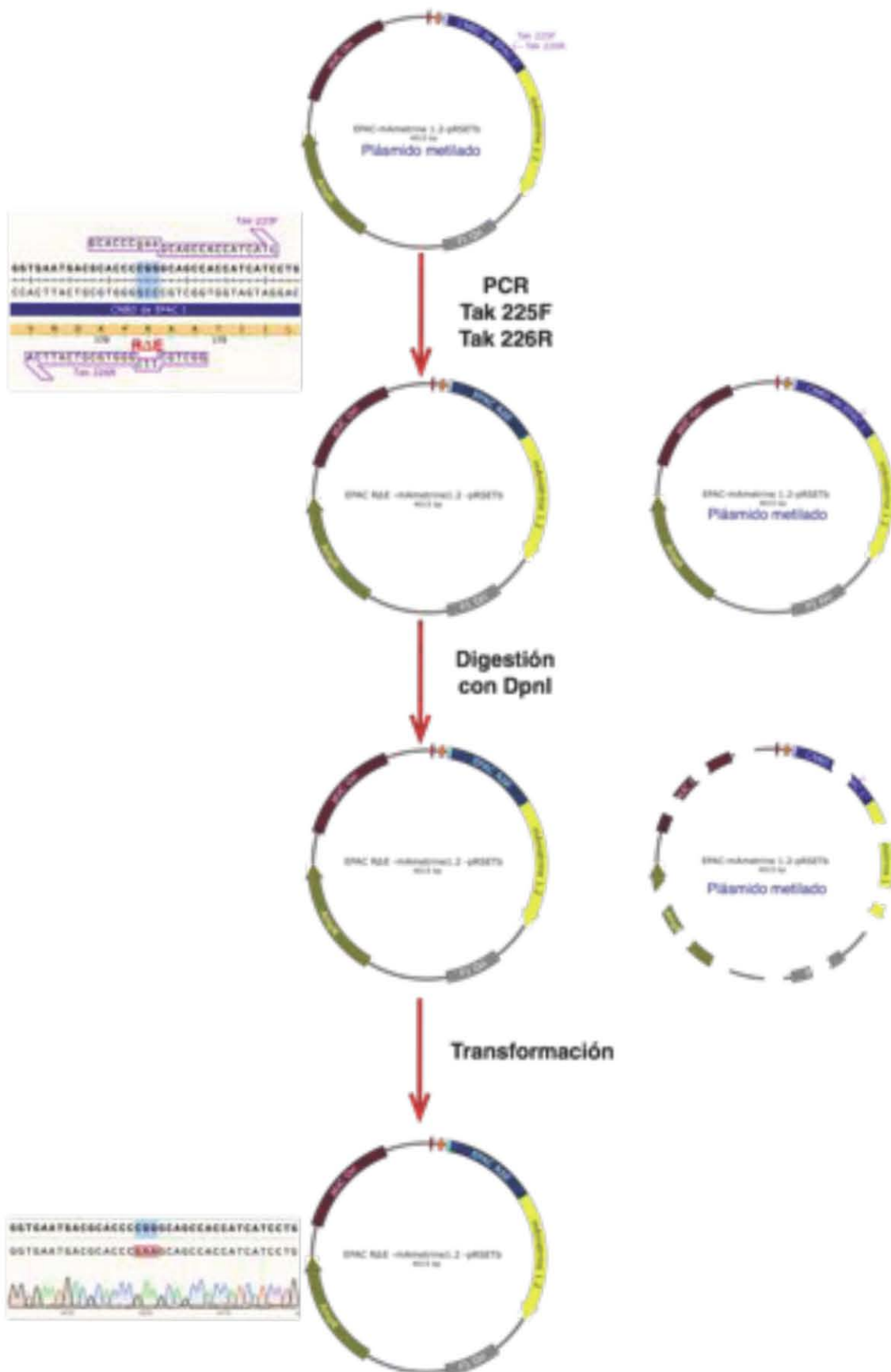


Figura suplementaria 4. Preparación del plásmido EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2-pRSET

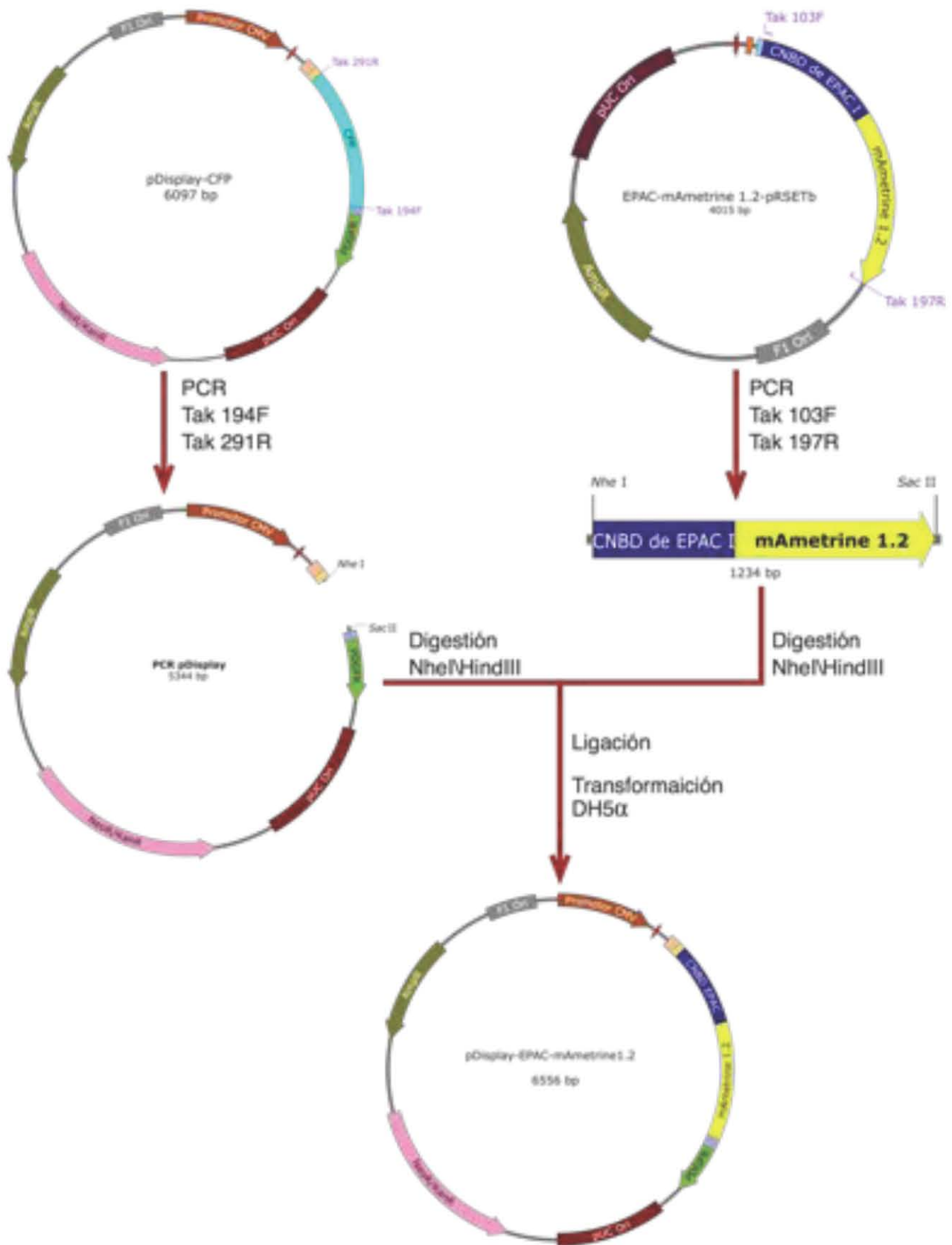


Figura suplementaria 5. Preparación del plásmido pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2

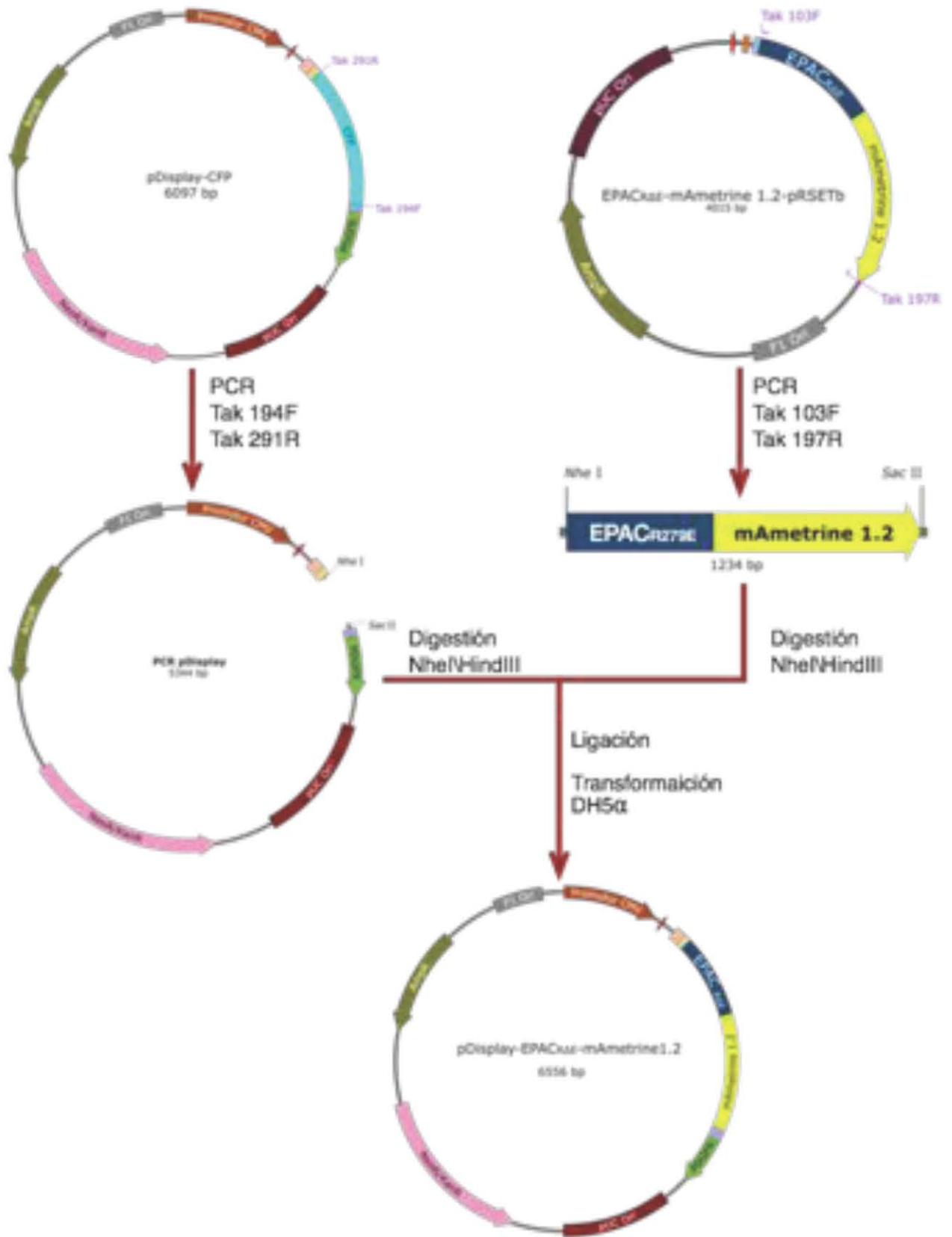


Figura suplementaria 6. Construcción de pDisplay-EPAC_{R279E}-mAmetrine1.2.

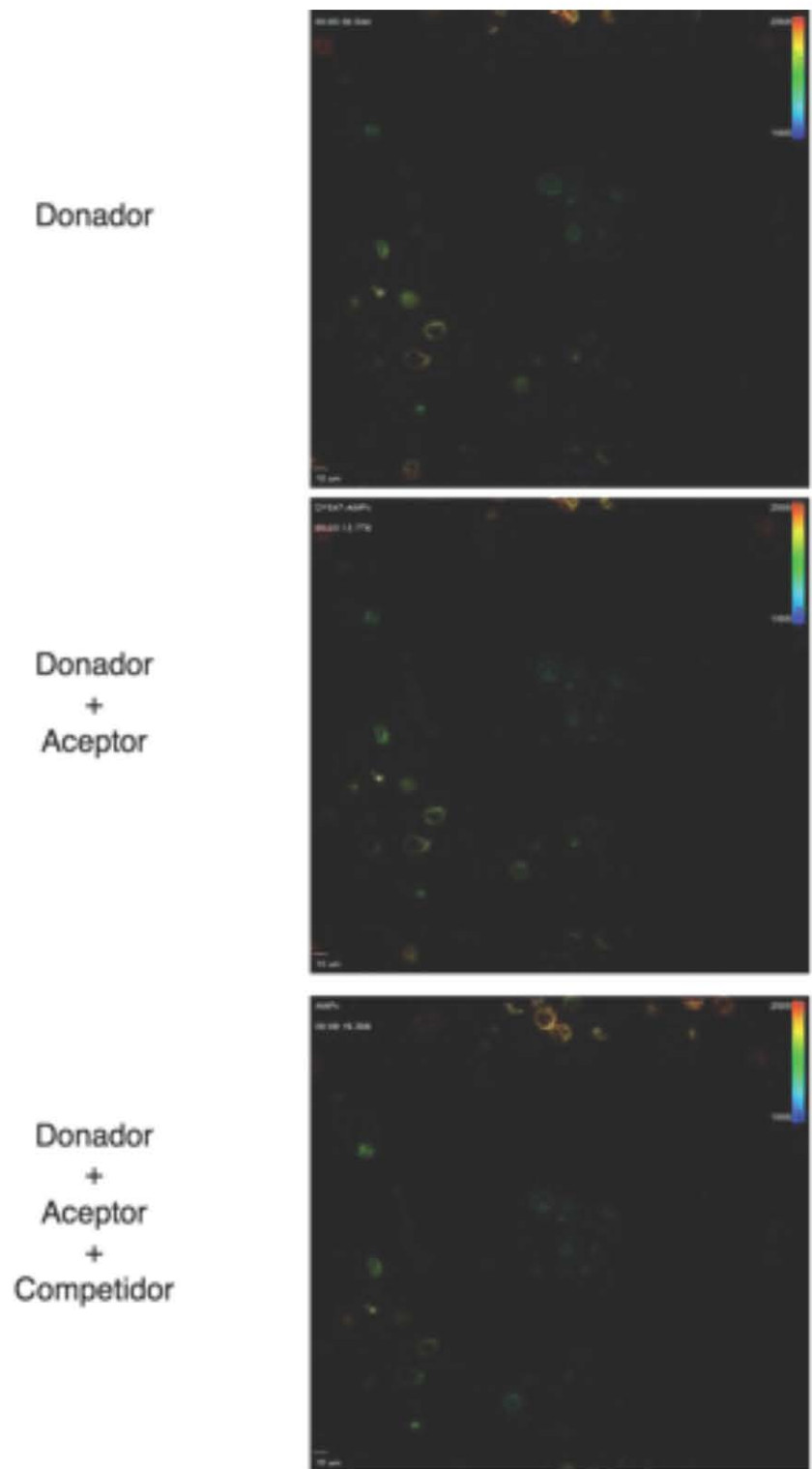


Figura suplementaria 7. Prueba piloto del ensayo de unión en células CHO transfectadas con pDisplay-EPAC-mAmetrine1.2

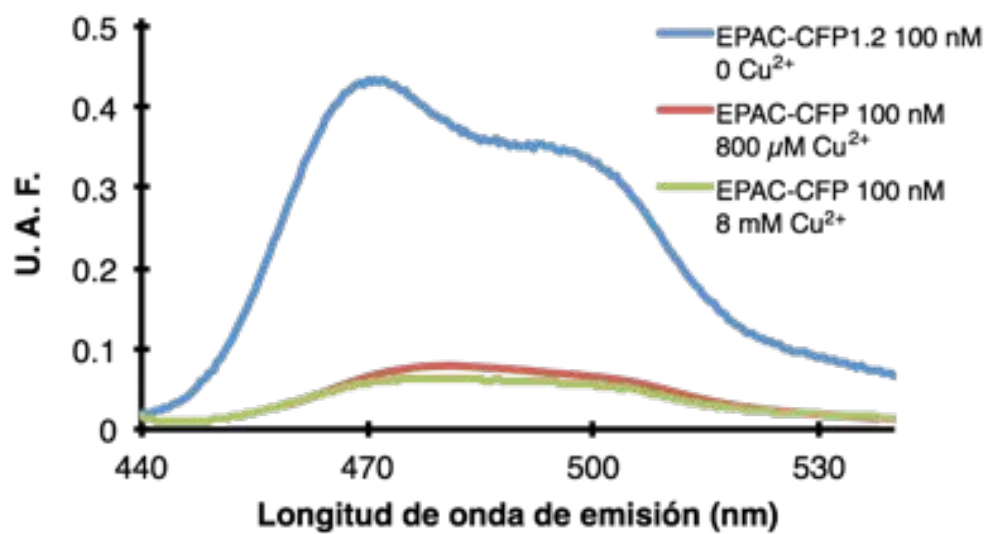
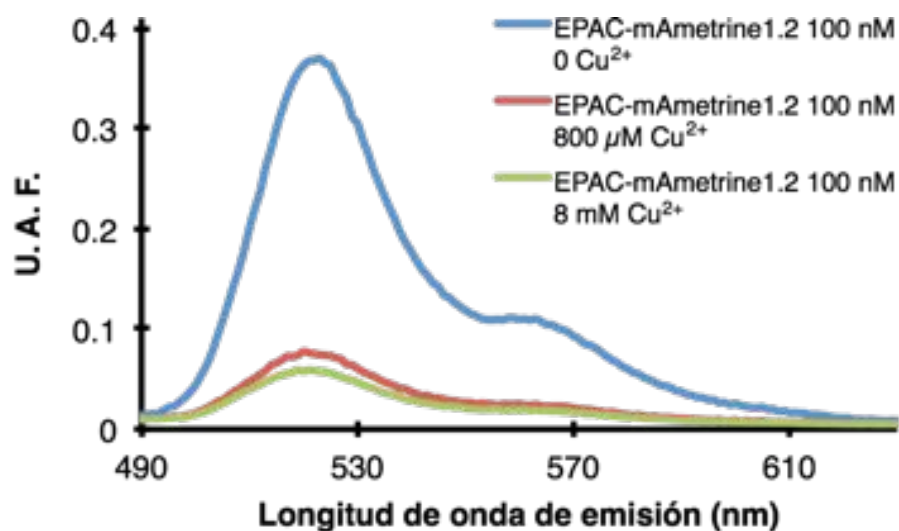
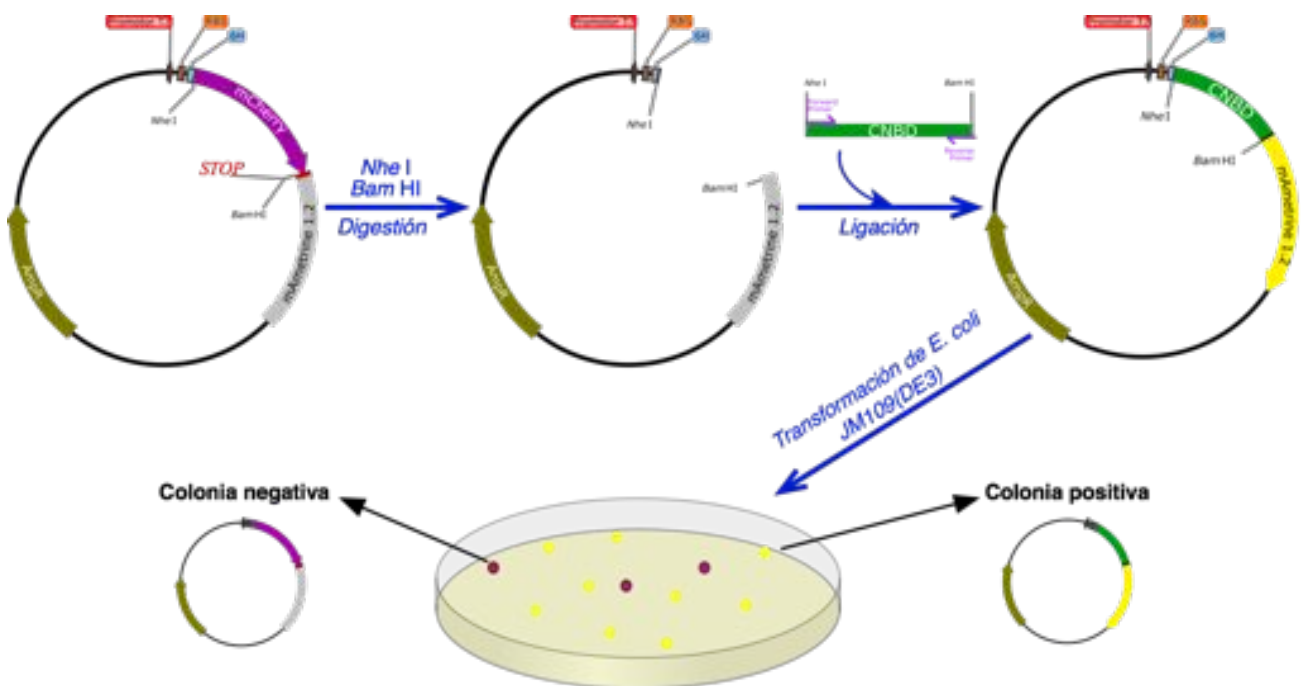


Figura suplementaria 8. Apagamiento de la fluorescencia de EPAC-mAmetrine1.2 y EPAC-CFP por Cu²⁺

APÉNDICE

Desarrollo de un método de clonación que permite la selección por color de colonias positivas para plásmidos del tipo CNBD-mAmetrine 1.2

Como se mencionó en el trabajo, el uso de las proteínas fluorescentes ofrece una clara ventaja para la selección de clonas positivas. Es por ello, que decidimos preparar un sistema de selección basado en el color para la preparación de futuros plásmidos con CNBDs de distintas proteínas. Para omitir el paso de la adquisición de los espectros de los inóculos de las posibles candidatas, decidimos utilizar a mCherry, la cual es una proteína fluorescente derivada de DsRed y a simple vista se puede diferenciar de mAmetrine1.2 tanto por el color que refleja, como por su fluorescencia.



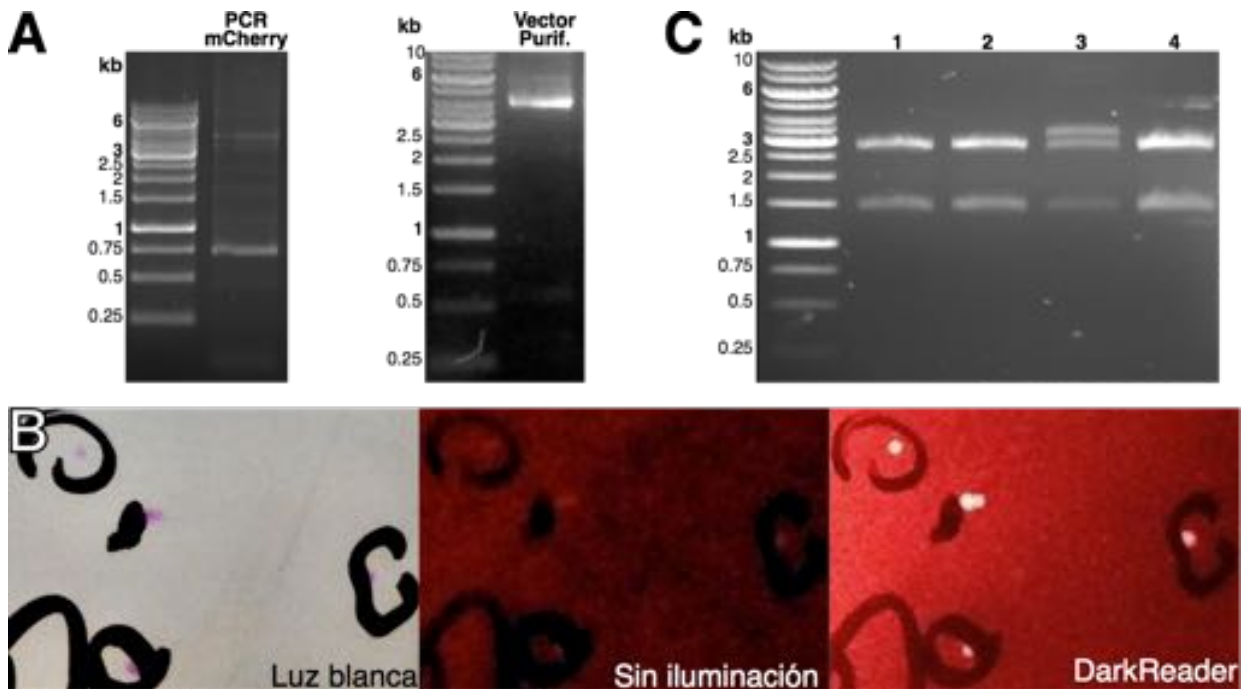
Sistema de selección basado en el color de las colonias. La figura muestra que la construcción de los plásmidos tipo CNBD-mAmetrine1.2 se realiza mediante el intercambio, mediante los sitios de restricción NheI y BamHI, del "cassete" de mCherry-codón de paro por la secuencia que codifica al CNBD, por lo que si el marco de lectura es correcto las colonias positivas serán las verde-amarillas (por mAmetrine1.2) y las negativas las moradas (por mCherry).

Por ello diseñamos una construcción que en lugar de CNBD tuviera la secuencia de mCherry, un codón de paro y la secuencia de mAmetrine 1.2. De esta

manera las colonias con ese plásmido se verían de color magenta y con fluorescencia roja, mientras que las colonias portadoras de plásmidos tipo CNBD-mAmetrine1.2 serían amarillas.

♦ **Preparación del plásmido mCherry-stop-mAmetrine 1.2-pRSETb**

En el plásmido EPAC-mAmetrine 1.2-pRSETb, la secuencia que codifica para el CNBD de EPAC I se encuentra flanqueada por los sitios NheI y BamHI, por lo que decidimos cambiar ese “cassette” por el del gen de mCherry más un codón de paro. Para agregar las secuencias del codón de paro y los sitios de restricción a mCherry preparamos oligonucleótidos específicos para realizar la PCR. A este plásmido lo nombramos mCherry-Stop-mAmetrine 1.2-pRSETb y servirá como base para preparar nuevos plásmidos del tipo CNBD-mAmetrine 1.2.

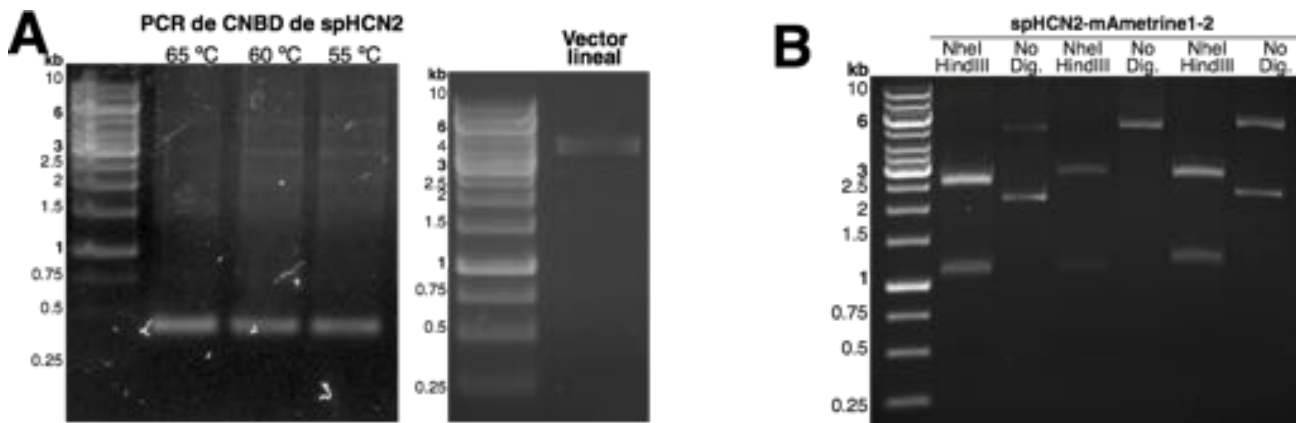


Preparación del plásmido mCherry-Stop-mAmetrine1.2-pRSET. En el gel de la izquierda del panel A se muestra el producto de la amplificación de mCherry con los cebadores Tak141F y Tak116R, los cuales añaden, los sitios de restricción NheI y codón de paro-BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente. En el gel de la derecha se muestra una banda correspondiente al vector pRSETb más mAmetrine1.2 purificado tras la digestión del plásmido EPAC-mAmetrine1.2-pRSET con las enzimas de digestión NheI-BamHI para su posterior ligación con mCherry. El panel B muestra las colonias con el plásmido mCherry-Stop-mAmetrine1.2-pRSETb resultantes de la transformación de células de *E. coli* de la cepa JM109(DE3) con la reacción de ligación. El panel C muestra el patrón de restricción de NheI-HindIII de plásmidos aislados de las colonias del panel B; en todos los casos corresponde al patrón esperado de las colonias positivas, donde la banda más grande corresponde al vector pRSETb (~2.8 kb) y la de 1.5 kb a dos proteínas fluorescentes (mCherry-stop-mAmetrine1.2).

♦ **Ejemplo de preparación de un plásmido tipo CNBD-mAmetrine 1.2 utilizando el método de selección por color**

Para probar nuestro método de selección por color, utilizamos el CNBD del canal iónico flagelar del erizo mar *Strongylocentrotus purpuratus* spHCN2, ya que hace años fue clonado en el laboratorio pero no se tienen registros electrofisiológicos ni se sabe si su CNBD es funcional.

Para intercambiar el “cassette” de mCherry-stop por el del CNBD de spHCN2 diseñamos oligonucleótidos específicos que flanquean al CNBD del canal y agregaran los sitios de restricción NheI-BamHI. Digerimos el producto de PCR y el vector por separado con las enzimas NheI-BamHI para su posterior ligación y selección por color. Una vez preparado el plásmido se confirmó por patrón de digestión y por secuenciación.



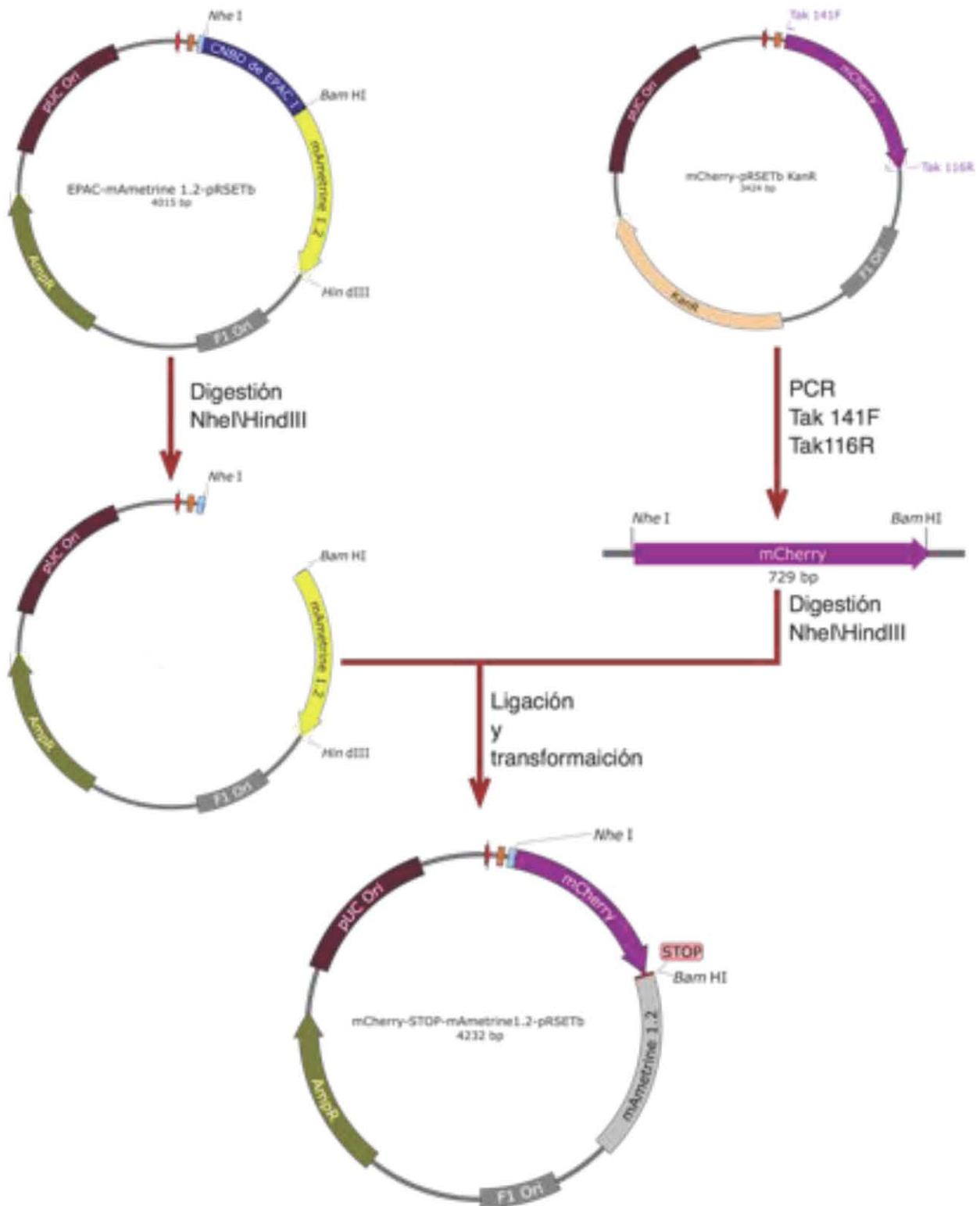
Preparación de spHCN2-mAmetrine1.2. En el panel A se muestra el producto de la reacción de PCR con los cebadores Tak31F y Tak30R para levantar el CNBD de spHCN2 añadiendo los sitios NheI y BamHI en sus extremos (~400 pb). El gel de la derecha muestra la banda correspondiente al vector pRSETb más mAmetrine1.2 resultado de la digestión del plásmido mCherry.stop-mAmetrine1.2 con las mismas enzimas. El panel B muestra el patrón de digestión con las enzimas NheI-HindIII esperado para spHCN2-mAmetrine1.2, donde la banda más grande corresponde al vector (2.8 kb) y la pequeña (~1.1 kb) al CNBD de spHCN2 unido a mAmetrine1.2.

Oligonucléotidos

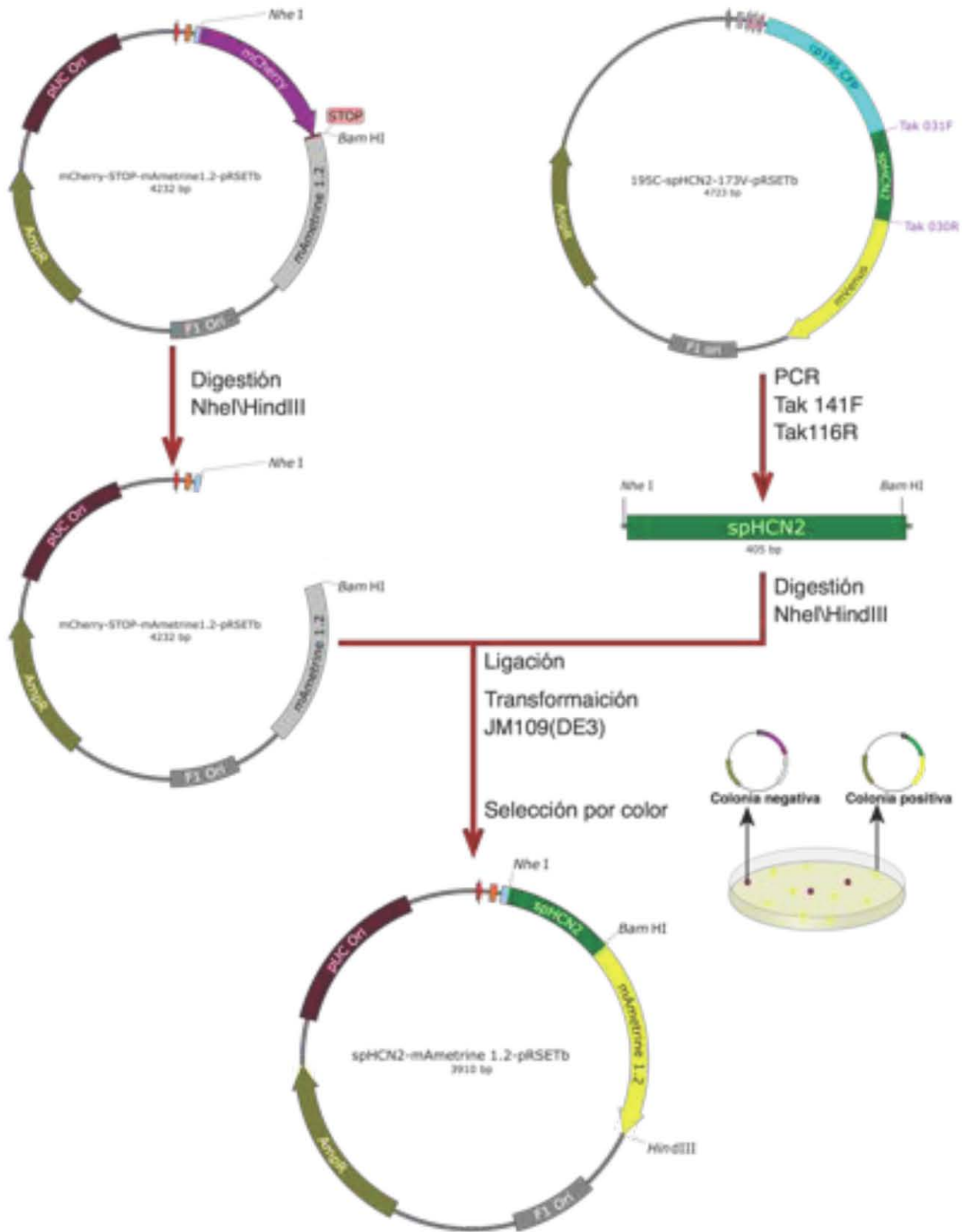
	Función	Secuencia (5'→3')
Tak 030R	Agrega el sitio de restricción BamHI al extremo 3' del CNBD de spHCN2	GCG GAT CCG AAT CGA TGG TGT TGA GAC GT
Tak 031F	Agrega el sitio de restricción NheI al extremo 5' del CNBD de spHCN2	GCG CTA GCA ACA ACT TCA TAA CAA AGG TCA ACT TC
Tak 116R	Agrega un codón de paro y el sitio de restricción BamHI en el extremo 3' de las FPs	GGT GGA TCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
Tak 141F	Agrega el sitio de restricción NheI al extremo 5' de las FPs	CCG GCT AGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG

Plásmidos

Nombre	Resistencia	Construido por
mCherry-pRSETb	Kan ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
195C-spHCN2-173V-pRSETb	Amp ^r	M. en C. Yoloxóchitl Sánchez-Guevara
EPAC-mAmetrine 1.2-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
mCherry-stop-mAmetrine 1.2-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo
spHCN2-mAmetrine 1.2-pRSETb	Amp ^r	Biol. Carmen Santana-Calvo

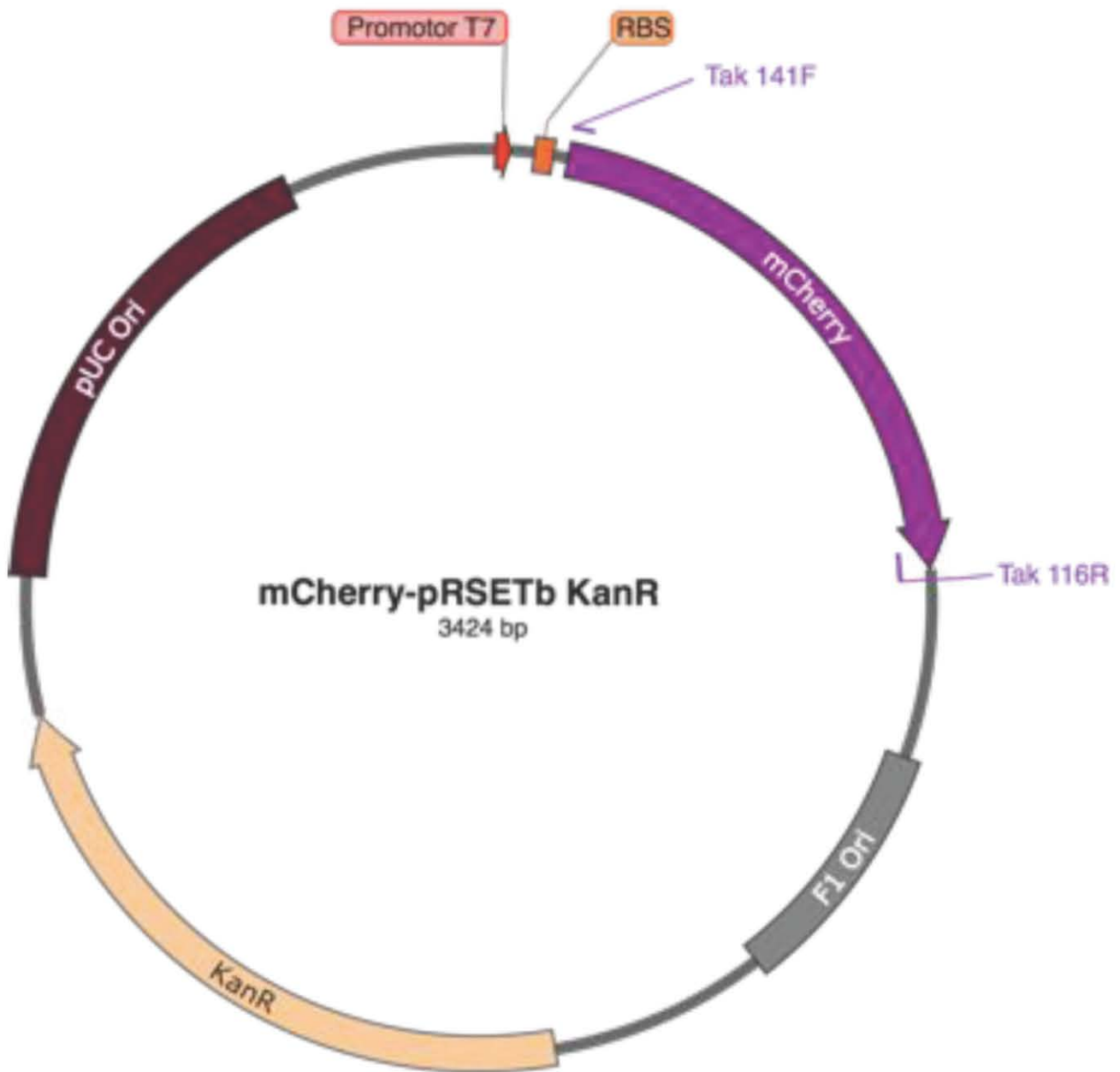


Construcción del plásmido mCherry-STOP-mAmetrine1-2-pRSETb



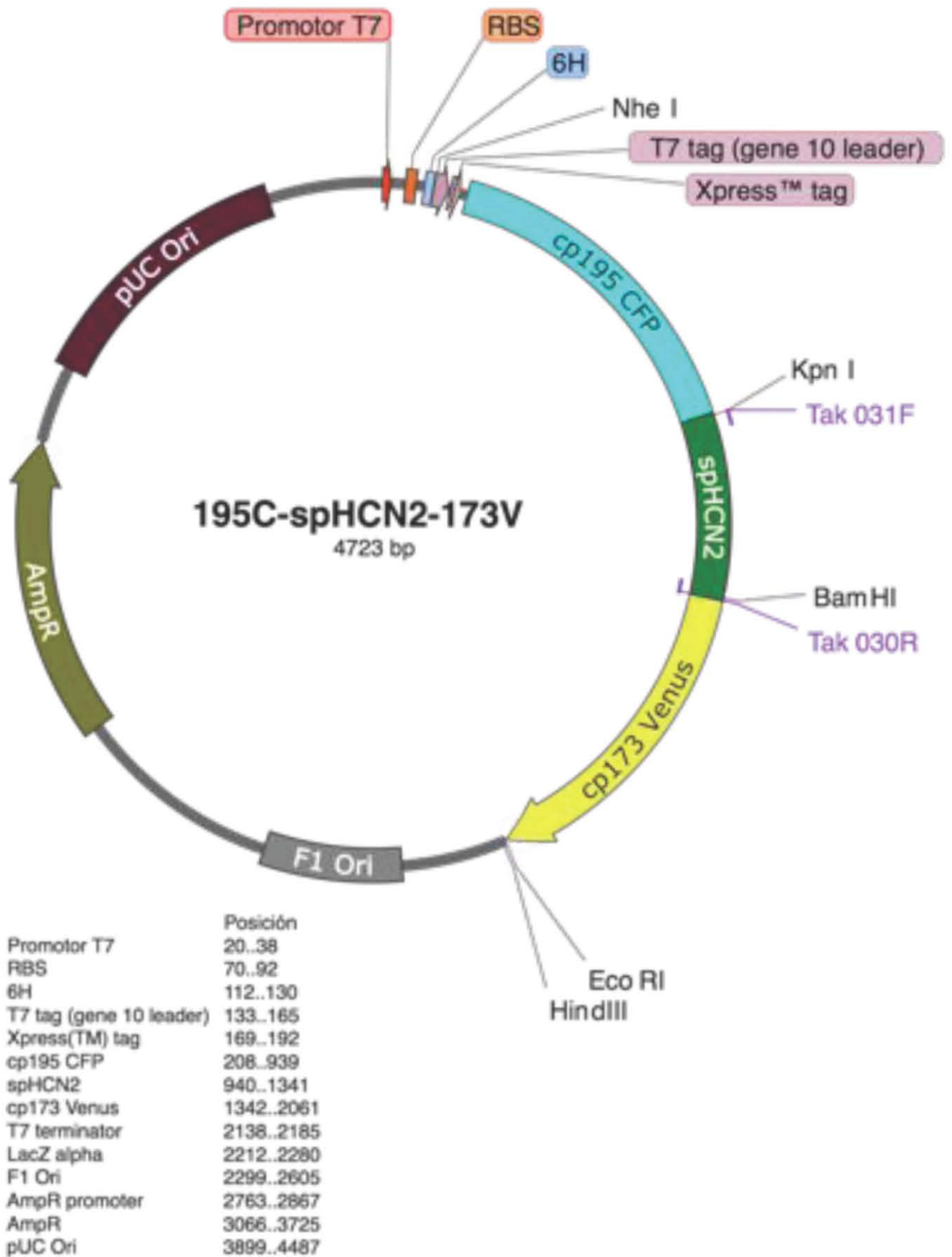
Preparación del plásmido spHCN2-mAmetrine1.2

- mCherry-pRSETb

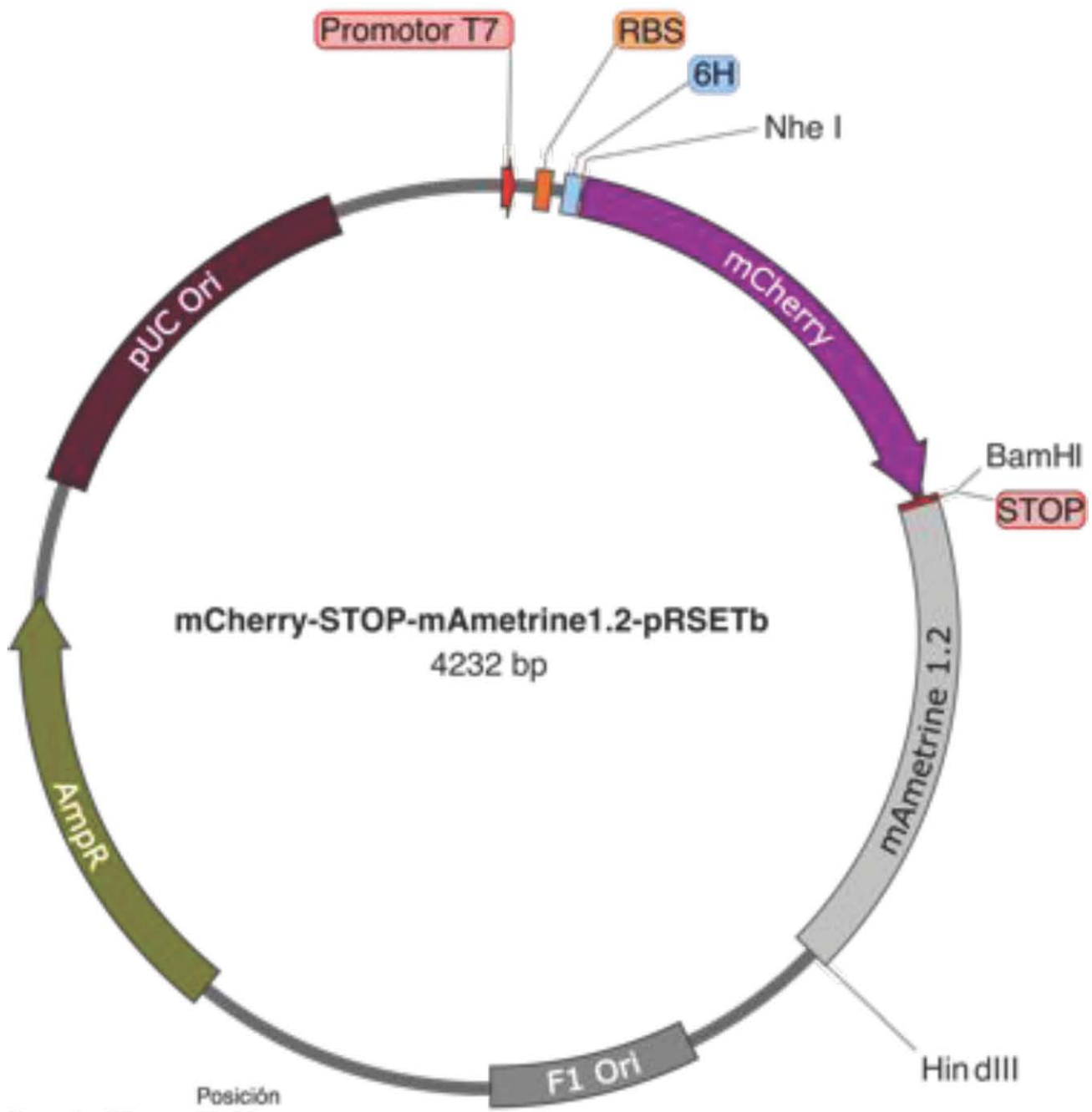


	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	67..89
mCherry	108..815
T7 terminator	885..932
F1 Ori	1046..1352
Promotor KanR	1510..1614
KanR	1620..2429
pUC Ori	2600..3188

• 195C-spHCN2-173V-pRSETb

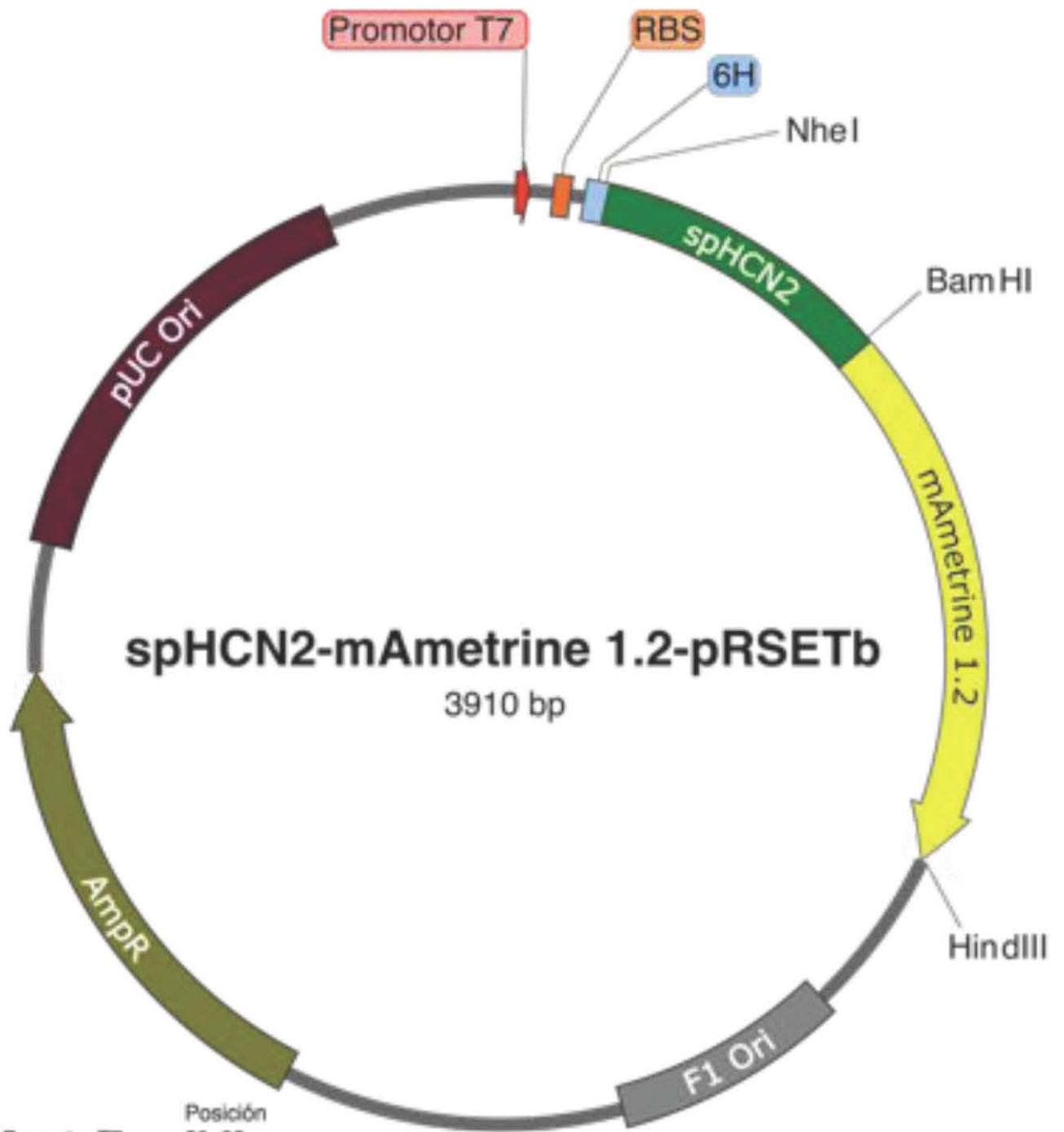


• mCherry-stop-mAmetrine 1.2-pRSETb



	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6H	112..136
mCherry	142..849
STOP codon	850..859
mAmetrine 1.2	860..1579
T7 terminator	1647..1694
LacZ alpha	1721..1789
F1 Ori	1808..2114
AmpR promoter	2272..2376
AmpR	2575..3234
ColE1 origin	3332..4014
pUC Ori	3408..3996

- spHCN2-mAmetrine 1.2-pRSETb



	Posición
Promotor T7	20..38
RBS	70..92
6H	112..140
spHCN2	141..537
mAmetrine 1.2	538..1257
T7 terminator	1325..1372
LacZ alpha	1399..1467
F1 Ori	1486..1792
AmpR promoter	1950..2054
AmpR	2253..2912
ColE1 origin	3010..3692
pUC Ori	3086..3674