



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Ensayo de unión tipo FRET *in vivo* entre un  
dominio de unión a nucleótidos cíclicos y  
AMPc**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**COLUMBA ALEJANDRA LÓPEZ  
VELARDE**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU**

**2019**



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.

1. Datos del alumno

López

Velarde

Columba Alejandra

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

313222669

2. Datos del tutor

Dr.

Takuya

Nishigaki

Shimizu

3. Datos del sinodal 1

Dr.

César Luis

Cuevas

Velázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Toshiko

Takahashi

Iñiguez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

6. Datos del sinodal

M en C

Ileana

De la Fuente

Colmenares

7. Datos del trabajo escrito:

Ensayo de unión tipo FRET *in vivo* entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc

82 p

2019

Con especial dedicatoria:

A mis padres porque ustedes son mi principal pilar, les agradezco todo el apoyo incondicional a mis decisiones, por guiarme y siempre ayudarme a cumplir mis sueños y por ser mis constantes maestros de vida (*<<yo los llevo dentro, hasta la raíz y por más que crezca estarán aquí>>*).

A mi hermano por ser mi cómplice de vida.

A mi familia porque son mi soporte.

## AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología, por marcar mi trayectoria académica.

A todas las personas que me han compartido su conocimiento, les agradezco profundamente porque son parte de mi crecimiento, especialmente a mi tutor Dr. Takuya Nishigaki por siempre recordarme que los errores son la base del aprendizaje y por transmitirme su curiosidad y pasión por la fluorescencia.

A todas las mujeres que se dedican a esta noble labor que es la ciencia, porque ellas son mi fuente de inspiración.

También quiero agradecer a la M. en C. Yoloxóchitl Sánchez Guevara por ser un gran apoyo técnico en el laboratorio, por su ayuda en la estructura del presente escrito y todas sus motivaciones.

Al M. en C. Héctor Vicente Ramírez Gómez por su tiempo para entender mi proyecto y así guiarme en el análisis de los datos, por alentarme a manejar el *software* R, por ser un ejemplo de constancia e inspiración para seguir mis pasiones.

Al M. en C. Esteban Suárez Delgado por su atención durante mi estancia en el laboratorio de Biofísica Molecular, su dedicación en la realización de *patch clamp*, su apoyo en el manejo del *software* Igor y todas su asistencia a distancia, sin su ayuda esta historia tendría otro final.

Al Biol. César Arcos Hernández por su compartirme su conocimiento de Biología molecular y ayudarme a realizar mis primeras construcciones.

Al M. en C. Jose Pablo Oviedo por su apoyo en la adquisición de imágenes de microscopía de epifluorescencia en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada.

Un especial agradecimiento a mi comité tutorial el Dr. César Cuevas, la Dra. Toshiko, la Dra. Claudia Andrea, la M en C. Ileana de la Fuente, ya que sus comentarios fueron una gran contribución al presente trabajo.

A la bella coincidencia <<en la vastedad del espacio y la inmensidad del tiempo>>.

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

Para la realización de esta tesis de licenciatura se recibió apoyo de los siguientes donativos: CONACyT (CB2017-2018 A1-S-8768) PAPIIT (DGAPA IN205719)

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABREVIACIONES</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
Señalización por AMPc .....	4
Proteínas con dominios de unión a nucleótidos cíclicos .....	6
Características estructurales del CNBD .....	9
EPAC (Proteína de intercambio activada directamente por AMPc) .....	11
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
Ensayo de unión tipo FRET .....	13
Antecedentes de ensayo de unión tipo FRET entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc .....	17
Proteína fluorescente mAmetrine1.2 .....	20
Análogos fluorescentes de AMPc .....	21
8-[Dy-547]-AMPc .....	21
8-Rodamina6G-AMPc .....	21
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
Objetivo general .....	23
Objetivos particulares .....	23
<b>VI. MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
Purificación y cuantificación de la proteína EPAC <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 .....	24
Ensayo de unión tipo FRET <i>in vitro</i> entre EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPc ..	26
Ensayo <i>in vitro</i> en el espectrofluorómetro .....	26
Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) entre EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPc .....	26
Espectros de fluorescencia de 8-Rodamina6G-AMPc .....	27
Construcción de plásmidos .....	27
Construcción de los plásmidos pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 .....	27
Mutagénesis de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 mediante <i>QuikChange</i> ....	29
Construcción de los plásmidos pCDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1 <sub>CNBD</sub> y pCDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1R279E <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 .....	30
Cultivo celular .....	31
Ensayo <i>in vivo</i> en microscopio confocal .....	32
Pruebas de permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPc .....	33

<b>Transfección de plásmidos en células eucariotas HEK293 .....</b>	<b>33</b>
<b>Ensayo <i>in vivo</i> con patch-clamp fluorometry.....</b>	<b>34</b>
Técnica de <i>patch-clamp fluorometry</i> .....	34
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>Ensayo de FRET <i>in vitro</i> entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC.....</b>	<b>37</b>
Preparación de EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2.....	37
Ensayo de competencia entre EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC.....	38
Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) entre EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC.....	40
Espectro de emisión de 8-Rodamina6G-AMPC .....	42
<b>Ensayo de FRET <i>in vivo</i> entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC con microscopía confocal.....</b>	<b>43</b>
Construcción de los plásmidos pcDNAPro-EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y pcDNAPro-EPAC1R279E <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2.....	43
Confirmación de la expresión de la proteína EPAC1 silvestre y mutante en células eucariotas HEK293.....	45
Prueba de ensayo de FRET <i>in vivo</i> mediante microscopía confocal.....	45
Pruebas de permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC.....	47
<b>Ensayo de FRET <i>in vivo</i> mediante sistema de fluorimetría con <i>patch clamp</i>.....</b>	<b>47</b>
Clonación de las construcciones pDNA3.1-PalmMyr-EPAC1 <sub>CNBD</sub> y EPAC1R279E <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 ...	48
Confirmación de la expresión de los plásmidos en células eucariotas HEK293 .....	50
Espectros de emisión obtenidos de las proteínas EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y EPAC1R279E <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 expresadas en células HEK293.....	50
Espectros de fluorescencia de EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2 y aceptores obtenidos mediante <i>patch-clamp fluorometry</i> .....	51
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
Ensayo de FRET <i>in vitro</i> .....	56
Ensayo de FRET <i>in vivo</i> .....	58
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>XII. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>67</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>75</b>
Confirmación de la expresión de pcDNA3.1(-)Pro-mCherry .....	75

## 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-Rodamina6G-AMPC	8- (5- Carboxirodamina6G-aminoetiltio) adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
$Abs_{\lambda_{max}}$	Longitud de onda del pico de absorción
AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CFP	Proteína fluorescente cian
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNG	Canales regulados por nucleótidos cíclicos
CAP	Proteína activadora de catabolitos, también llamada proteína que responde al AMPC (CRP)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEP	Dominio <i>Dishevelled</i> , <i>Egl-10</i> , <i>Pleckstrin</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
$Em_{\lambda_{max}}$	Longitud de onda de pico de emisión
EPAC	Proteína dependiente de AMPC que intercambia nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas
$Ex_{\lambda_{max}}$	Longitud de onda del pico de excitación
FAU	Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (FAU)
FRET	Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia de Förster
FBS	Suero fetal bovino
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GMPc	3', 5' Guanosín monofosfato cíclico
HCN	Canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
$K_d$	Constante de disociación

LB	Medio <i>Lysogeny broth</i> , también llamado <i>Luria-Bertani</i>
min	Minuto
pb	Pares de bases
PBC	Casete de unión a fosfato
PBS	Buffer de sodio-fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SLC	Familia de transportadores de solutos
sNHE	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> específico del espermatozoide
tdTomato	tándem Tomate, proteína roja fluorescente
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$\Phi$	Eficiencia o rendimiento cuántico

## RESUMEN

Una característica distintiva de las células es la capacidad de responder ante los estímulos externos a través de pequeñas moléculas señaladoras llamadas segundos mensajeros. Estos se encargan de transmitir y amplificar las señales recibidas del ambiente extracelular al interior de la célula para desencadenar una respuesta.

El adenosín monofosfato-3', 5'(AMPC) es un segundo mensajero que participa en una amplia variedad de eventos fisiológicos celulares a través de la interacción con diferentes proteínas blanco. A pesar de que cada proteína blanco cumple una función biológica distinta, todas se caracterizan por tener un dominio conservado de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, por sus siglas en inglés) en el cual se une el AMPC para controlar su actividad. El CNBD regula la actividad de diferentes tipos de proteínas, tales como factores de transcripción, cinasas, canales iónicos y factores de intercambio de nucleótidos GDP-GTP en GTPasas pequeñas como EPAC1 y EPAC2 (proteína dependiente de AMPC que intercambia nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas, por sus siglas en inglés) (Bos, 2006; Kannan *et al.*, 2007).

El equipo de Kannan y colaboradores (2007) identificaron una serie de residuos conservados por medio del alineamiento de múltiples secuencias de CNBD, que resultan ser claves para definir su funcionalidad. Uno de estos residuos es la arginina, que se une al grupo fosfato del AMPC y se encuentra en el casete de unión a fosfato (PBC, por sus siglas en inglés) del CNBD. Anteriormente se infería que las proteínas que no tenían este aminoácido en el PBC del CNBD no eran funcionales para la unión de nucleótidos cíclicos. Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos CNBD contienen un aminoácido diferente a la arginina en su PBC y parecen ser funcionales (Jiang *et al.*, 2017).

Lo anterior sugiere que los análisis bioinformáticos no son suficientes para caracterizar y predecir la actividad de los CNBD. El grupo del Dr. Nishigaki (2017) desarrolló un ensayo de unión *in vitro* con base en FRET para determinar la interacción entre un CNBD de EPAC1 y AMPC. Para realizar dicho ensayo es necesario purificar el CNBD de interés que en algunas proteínas resulta ser complicado. Un caso referente al grupo del Dr. Nishigaki es el CNBD del sNHE (intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  específico del espermatozoide, por sus siglas en inglés) que no se logró producir de manera recombinante. Sin embargo, se logró expresar en sistemas eucariotes, sugiriendo que el intercambiador requiere del ambiente citoplasmático para su estabilidad y plegamiento adecuado (Romero, 2018).

Por lo anterior, en el presente proyecto se planteó desarrollar un ensayo de unión *in vivo* basado en FRET para determinar en tiempo real la interacción molecular entre un CNBD y el AMPc de manera directa y confiable. Se utilizó como donador a la proteína fluorescente mAmetrine1.2 unida al CNBD de EPAC1 y como aceptor un nuevo análogo fluorescente de AMPc llamado 8-Rodamina-6G-AMPc que se sintetizó en el laboratorio.

Se confirmó que el análogo 8-Rodamina-6G-AMPc sirve como un aceptor eficiente para mAmetrine1.2. Se logró determinar la constante de disociación (Kd) de la quimera EPAC1-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina-6G-AMPc *in vitro*. Sin embargo, en el ensayo de unión *in vivo* preliminar, no se observó FRET debido a que el análogo fluorescente no es lo suficientemente permeable a la membrana para realizar el ensayo.

Partiendo de esto, se utilizó la técnica *patch clamp fluorometry (whole cell)* con el fin de introducir el colorante a la célula por medio de la pipeta. Se probaron dos análogos fluorescentes 8-Rodamina-6G-AMPc y 8-[Dy-547]-AMPc debido a la similitud de sus características espectroscópicas. Mediante esta técnica fue posible determinar la interacción molecular entre EPAC1-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina-6G-AMPc así como 8-[Dy-547]-AMPc con base en FRET.

Esta técnica permitirá estudiar la función de los CNBDs que no son capaces de producirse de manera recombinante, y caracterizarlos en un ambiente celular fisiológico.

**Palabras clave: FRET *in vivo*, CNBD, AMPc, fluorimetría, patch clamp**

## I. INTRODUCCIÓN

### Señalización por AMPc

Todos los organismos tanto procariontes como eucariontes tienen la capacidad de monitorear su ambiente intra y extracelular, en consecuencia, son capaces de responder a diversos estímulos mediante vías de señalización. Estos estímulos son fisicoquímicos, como cambios de pH, luz, temperatura, composición iónica del medio, potencial de membrana, compuestos moleculares, entre otros. Dentro de los compuestos moleculares se encuentran los permeables y los impermeables a la membrana. Los permeables, por lo general son moléculas pequeñas como el monóxido de carbono (CO) y/o moléculas hidrofóbicas como las hormonas esteroides. Su capacidad de permear la membrana celular les permite activar directamente su proteína blanco en el interior de la célula. Por otro lado, los compuestos impermeables están formados por moléculas de mayor tamaño y/o

hidrofílicas, por lo que transmiten su información mediante receptores que se encuentran en la membrana celular como proteínas, péptidos, aminoácidos u hormonas (Alberts *et al.*, 2015).

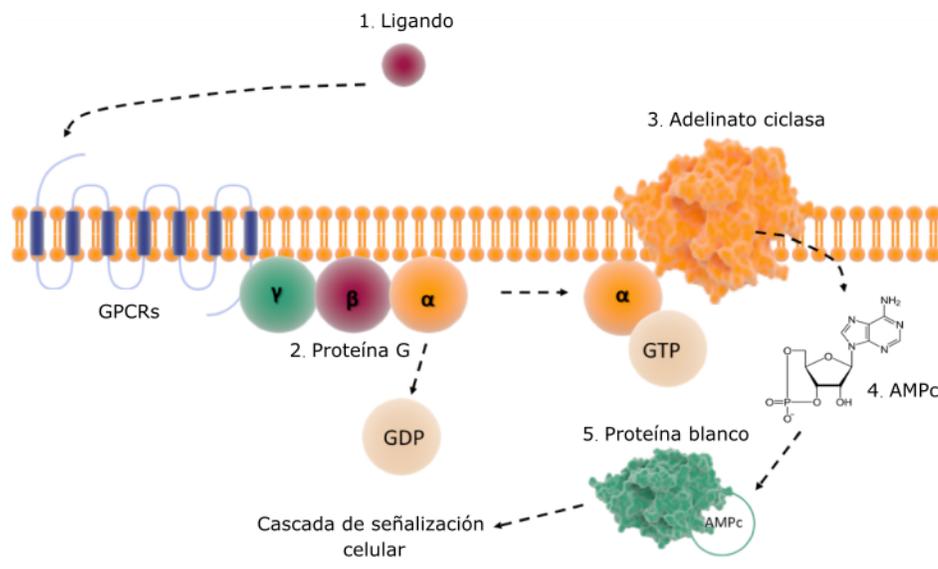
En la señalización celular juegan un papel fundamental, pequeñas sustancias químicas llamadas segundos mensajeros ya que se encargan de transmitir las señales recibidas de los receptores que se encuentran en la membrana plasmática al interior de la célula (Alberts *et al.*, 2015). Entre algunos de los segundos mensajeros se encuentran el diacilglicerol (DAG), el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), algunos iones como el Ca<sup>2+</sup> y nucleótidos cíclicos como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y el guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (Lodish *et al.*, 2000).

Una de las vías más estudiadas es la señalización por AMPc ya que se encuentra en todos los reinos (Qiao *et al.*, 2002) y participa en una variedad de eventos celulares, incluyendo secreción, modelado citoesquelético, migración celular, proliferación, diferenciación, apoptosis, regulación de metabolismo, expresión génica e incluso en mecanismos de virulencia (Dremier *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2002).

El papel de los segundos mensajeros no es únicamente transmitir un estímulo externo al interior celular, sino también amplificar la señal. Una señal extracelular puede aumentar la concentración de AMPc más de veinte veces por segundo dentro de la célula, gracias a la enzima adenilato ciclasa (AC). Esta enzima en células eucariontes es una proteína transmembranal que consta de dos dominios catalíticos, se encuentra en el lado citosólico de la membrana plasmática y su regulación se lleva a cabo mediante proteínas G, las cuales están compuestas por tres subunidades;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Steebhorn, 2014). En el estado inactivo (reposo), la subunidad  $\alpha$  está unida a GDP. Una vez que se une el ligando al receptor acoplado a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), este es activado y actúa como factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF, por sus siglas en inglés), lo cual provoca la liberación de GDP de la subunidad  $\alpha$  y de manera consecuente la unión a GTP. La unión de la subunidad  $\alpha$  a GTP induce un cambio conformacional en la proteína G, lo cuál le permite la unión a la enzima adenilato ciclasa, provocando un aumento de la síntesis de AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP) (Alberts *et al.*, 2015) (Fig. 1).

Una vez que aumenta la concentración de AMPc, la cascada de señalización continúa, por lo tanto, el segundo mensajero se une a diversas proteínas blanco, como la proteína cinasa A (PKA), el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (EPAC), canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG), canales activados por hiperpolarización, canales regulados por nucleótidos cíclicos (HCN), proteína activadora de catabolitos (CAP), también conocido

como proteína que responde al AMPc (CRP) entre otras, las cuales al activarse permiten a la célula generar múltiples respuestas ante los estímulos externos (Rehmann *et al.*, 2007).



**Figura 1. Cascada de señalización celular a través de AMPc.** 1) Al unirse un ligando a un GPCR, se activa la proteína G, 2) lo que provoca la liberación de GDP de la subunidad  $\alpha$  y en consecuencia la unión a GTP. 3) Esto genera un cambio conformacional que le permite la unión a la enzima adenilato ciclasa, 4) provocando un aumento de la síntesis de AMPc. 5) El segundo mensajero se une a proteínas blanco que generan una cascada de señalización celular (Modificado de [www.bioquimicadental.wordpress.com](http://www.bioquimicadental.wordpress.com)).

### Proteínas con dominios de unión a nucleótidos cíclicos

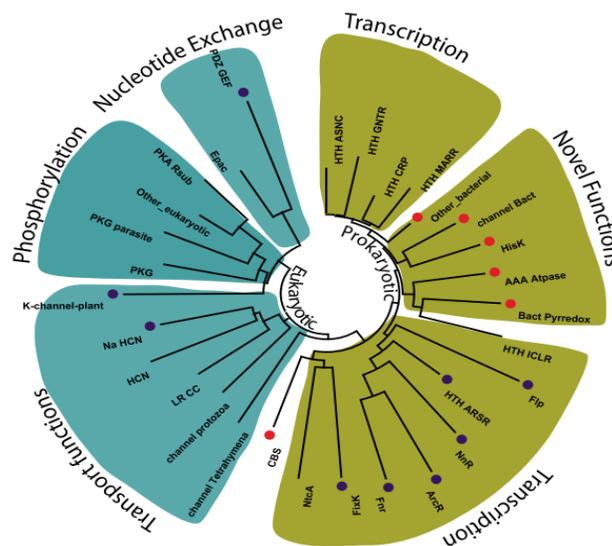
Se han identificado diversas proteínas blanco de nucleótidos cíclicos. A pesar de que estas proteínas median funciones biológicas diferentes, todas cuentan con dominios conservados donde se unen los nucleótidos cíclicos. Se han establecido dos dominios principales, el dominio GAF y el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) que se unen a AMPc o GMPc y controlan la actividad de la proteína (Rehmann *et al.*, 2007).

Los CNBD conocidos y predichos por análisis bioinformáticos se clasifican en 30 familias distintas, las cuales corresponden a proteínas en organismos eucariontes y procariontes. En eucariontes son clasificados en tres categorías: 1) las familias con dominio cinasa asociados a PKA y PKG, 2) el factor de intercambio de nucleótidos guaninina (EPAC) y 3) los dominios transmembranales que contienen canales HCN y de  $\text{Na}^+$ . Además de estas tres categorías, se encuentran nuevos CNBD en metazoarios como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  específico del espermatozoide (sNHE) (Windler *et al.*, 2018), canales tipo HCN en protozoarios y, por último, CNBD en plantas. En procariontes algunos de los grupos más grandes son los miembros de la familia CRP, que contienen un dominio de unión al DNA que se encuentra

unido por enlaces covalentes al CNBD. También, se encuentran histidinas cinasas (HisKs), dominios de cistationina beta sintasa, ATPasas AAA, entre otras, conocidas como nuevas proteínas con CNBDs predichos (Fig. 2) (Kannan *et al.*, 2007).

Las proteínas blanco con CNBD que se unen específicamente a AMPc se encuentran distribuidas en los diferentes reinos biológicos. En *Escherichia coli*, el factor de transcripción proteína activadora del gen catabolito (CAP) actúa como el principal efector. En células de mamífero son bien conocidas al menos cuatro tipos de proteínas blanco de AMPc: proteína cinasa A (PKA), canales de iones activados por nucleótidos cíclicos (CNG y HCN), factor de intercambio activado por AMPc (EPAC) y fosfodiesterasas (PDE) (Steegborn, 2014).

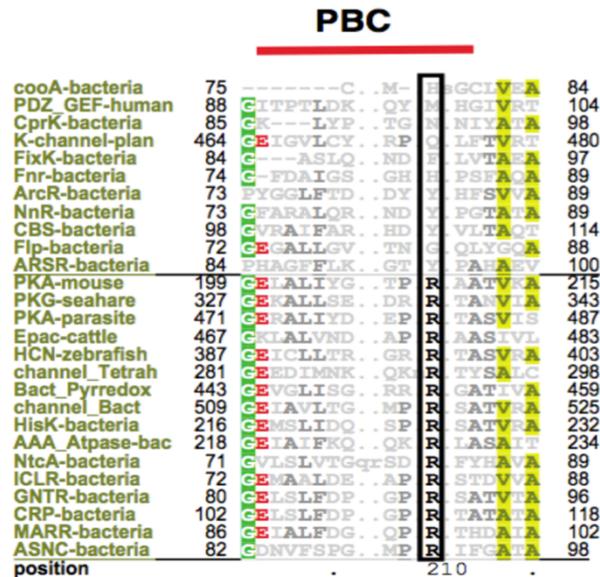
Por medio de un alineamiento múltiple de secuencias de CNBD obtenidas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y GOS (*Global Ocean Sampling Expedition*) se identificaron residuos conservados que resultan ser claves para definir el *core* del CNBD (Kannan *et al.*, 2007). Uno de estos residuos es una arginina que se encuentra en el casete de unión a fosfato (PBC) dentro del dominio del CNBD, la cual se une al grupo fosfato del AMPc. Mutaciones en esta arginina alteran la unión entre las proteínas y AMPc, por ejemplo, en la proteína PKA de humano, la mutación R(279)L, reduce la afinidad por el AMPc casi diez veces (Kannan *et al.*, 2007); en la proteína EPAC1 de humano, la mutación R(279)E impide su interacción con AMPc (Qiao *et al.*, 2002), por lo que dicho aminoácido es esencial para la unión del nucleótido.



**Figura 2. Clasificación de las familias que contienen CNBDs.** Árbol filogenético de las 30 familias identificadas. Las ramas correspondientes a eucariontes se muestran de color azul mientras que las ramas de procariontes se muestran en verde. Las familias recién identificadas en bacteria están indicadas con un punto rojo. Las familias que tienen un aminoácido diferente a la arginina (R) están indicadas por puntos morados (Kannan *et al.*, 2007).

Por otro lado, existen múltiples proteínas que contienen un aminoácido distinto a arginina en el PBC (Fig. 3). Algunas de ellas interactúan con moléculas distintas a los nucleótidos cíclicos, mientras que otras mantienen una interacción específica a nucleótidos cíclicos.

Un ejemplo es la proteína PDZ\_GEF (Rapgef2), que participa en la vía de señalización para la activación de dopamina. A pesar de que tiene un aminoácido de metionina en la posición de arginina, se mostró recientemente que su dominio CNBD es funcional (Jiang *et al.*, 2017).



**Figura 3. Alineamiento de secuencias de familias de proteínas que tienen motivos PBC con o sin R.** Se resaltan los residuos conservados y se indican las argininas de la posición 209 dentro del cuadro negro (Kannan *et al.*, 2007).

Otra proteína que se propone como blanco a AMPc, es el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  específico del espermatozoide (sNHE), el cual es indispensable para la motilidad del espermatozoide y, por lo tanto, la fertilidad. El sNHE pertenece a la familia de transportadores de solutos (SLC, por sus siglas en inglés), ubicado en la subfamilia SLC9C1.

La especie *Strongylocentrotus purpuratus*, comúnmente conocida como erizo de mar morado, presenta un homólogo del sNHE en el espermatozoide (*SpSLC9C1*). Windler y colaboradores (2018) lograron demostrar su regulación por nucleótidos cíclicos mediante la expresión heteróloga de *SpSLC9C1*.

Estudios de Wang y colaboradores (2003) confirman que los espermatozoides de ratones nulos de dicho intercambiador presentan una severa disminución en la motilidad (<5% de células motiles) así como en la velocidad progresiva, en comparación con los silvestres. La suplementación del medio con análogos de AMPc resultó efectiva para revertir el efecto en

la motilidad en los espermatozoides del ratón nulo. Esta evidencia junto con la presencia de un CNBD en la región C-terminal del intercambiador (Quill *et al.*, 2006) podrían indicar que el dominio es funcional y que está regulado por nucleótidos cíclicos.

Hasta el momento no se ha reportado la función del CNBD de sNHE en el espermatozoide de mamíferos.

### Características estructurales del CNBD

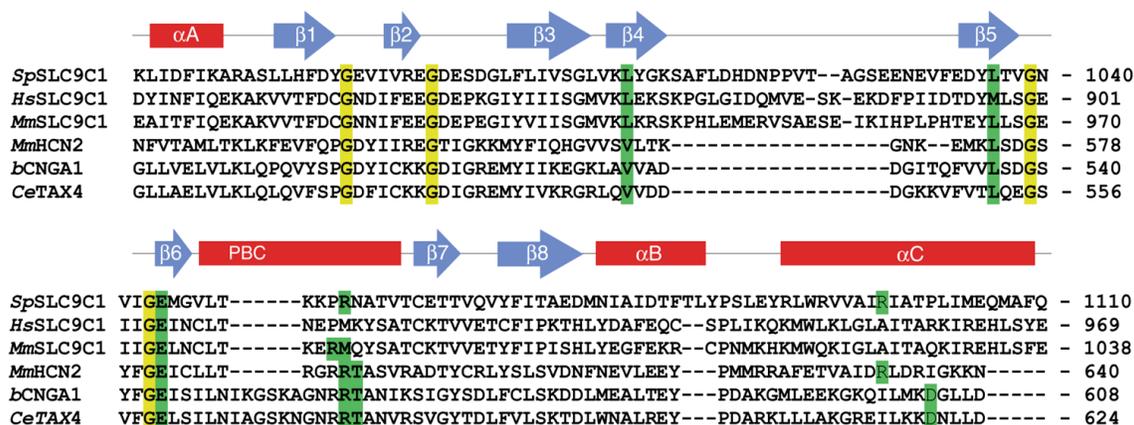
Las primeras evidencias del mecanismo que induce cambios conformacionales en el CNBD debido a la unión de nucleótidos cíclicos provienen de la determinación de la estructura cristalina de los CNBD de EPAC2 libres de unión, lo que permitió comparar con la estructura del CNBD con su ligando (Rehman *et al.*, 2002). Debido a la alta similitud estructural de todos los CNBD, fue posible hacer una predicción general sobre los cambios conformacionales inducidos por nucleótidos cíclicos. Esta predicción posteriormente se confirmó y detalló cuando se obtuvieron las estructuras de los CNBD libres de nucleótidos de algunos canales iónicos, así como de PKA (Rehmann *et al.*, 2007).

El CNBD es un módulo de señal conservado en algunas proteínas que está involucrado en la respuesta a la unión de segundos mensajeros como el AMPc y GMPc (Rehmann *et al.*, 2007).

El CNBD presenta un pliegue de unión a nucleótidos cíclicos que consta de tres hélices  $\alpha$  ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$  y  $\alpha C$ ), ocho cadenas  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) y un casete de unión de fosfato (PBC) (Windler *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, este dominio presenta residuos conservados que son claves. Algunos de ellos interactúan con los nucleótidos cíclicos, como los aminoácidos Val y Leu en las cadenas  $\beta 4$ - $\beta 5$  los cuales se unen a la purina. En la cadena  $\beta 6$  se encuentran la Gly o Glu que se enlazan con los residuos de unión a ribosa; entre la cadena  $\beta 6$  y  $\beta 7$  se encuentra la Arg que participa en la unión a fosfato y en la hélice  $\alpha C$ , se encuentra la Arg o Lys que se unen a residuos de purina (Fig.4) (Windler *et al.*, 2018).

La topología  $\beta$ -plegada es altamente conservada y muy similar en todos los dominios CNBD a diferencia de la topología  $\alpha$ -hélice, que es menos conservada en cuanto a estructura y secuencia. El PBC consiste de una hélice corta y un *loop* que está insertado entre dos cadenas  $\beta$ , estos residuos interactúan directamente con el grupo fosfato del nucleótido cíclico (Rehmann *et al.*, 2007).



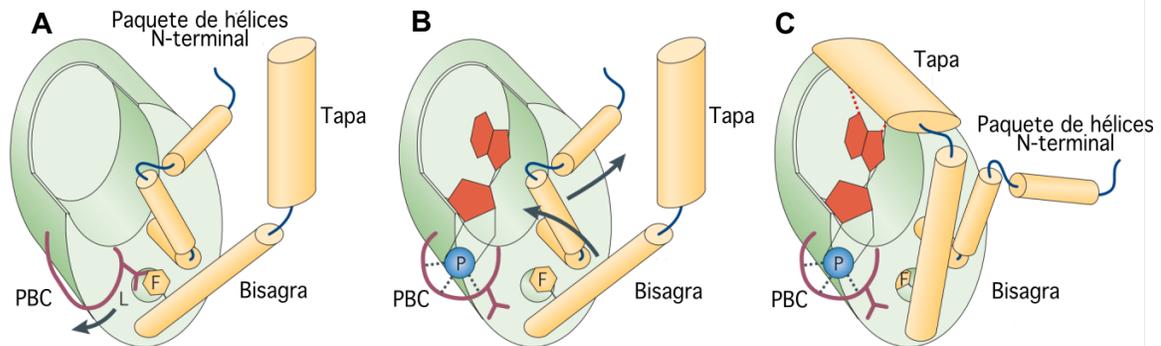
**Figura 4. Alineamiento de secuencias de CNBD del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, canal HCN y canal CNG.** Las secuencias corresponden al CNBD del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de erizo de mar (*SpSLC9C1*), humano (*HsSLC9C1*) y ratón (*MmSLC9C1*), canal HCN de ratón (*MmHCN2*), canal CNG bovino (*bcNGA1*) y canal CNG de *C. elegans* (*CeTAX4*). Los CNBD constan de tres α-hélices (αA, αB y αC), ocho β-plegada y un casete de unión a fosfato (PCB). Los residuos clave se encuentran resaltados; residuos de unión a purina (Val y Leu) en β4 y β5, los residuos de unión a la ribofuranoza (Gly/Glu) en β6, los residuos de unión a fosfato (Arg/Thr) en el PBC y el residuo de unión a purina (Arg) en αC de *MmHCN2* (Windler *et al.*, 2018).

En la región C-terminal de la β-plegada, el dominio contiene una α-hélice, llamada bisagra, con residuos de Phe o Tyr. Dicha región está conservada en todos los CNBD pero varía en longitud y cambia la posición dependiendo de la unión del nucleótido cíclico. Posterior a la bisagra se encuentra una tapa conformada también de α-hélices. En la región N-terminal, la estructura consiste de α-hélices, una corta y dos largas, llamadas colectivamente paquete de hélices N-terminal (Rehmann *et al.*, 2007).

Al unirse el nucleótido cíclico el CNBD sufre cambios conformacionales (Fig. 5) como una reorientación del PBC, provocando el movimiento de la bisagra, la tapa y, por lo tanto, un rearrreglo en la región del paquete de hélice N-terminal (Rehmann *et al.*, 2007).

El PBC, especialmente el residuo de Arg, está en la posición correcta para aceptar las uniones con los hidrógenos del nucleótido cíclico, por lo tanto, es probable que estas interacciones sean las primeras en formarse y sean usadas como guías para la correcta posición del nucleótido. Una vez que se une el AMPc, se forma la red completa de enlaces de hidrógeno entre el PBC y el nucleótido, que incluye un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del grupo fosfato del nucleótido cíclico y un residuo de Ala en el grupo amino, esto induce un ajuste del PBC y en consecuencia la reposición de un residuo de Leu (Rehmann *et al.*, 2007).

En ausencia de algún ligando, el movimiento de la bisagra se encuentra bloqueado estéricamente por el residuo de Leu. Al formarse los enlaces de hidrógeno entre el PBC y el nucleótido, se mueve el residuo de Leu y en su lugar, se unen residuos conservados de Tyr o Phe de la bisagra. Esta liberación de la tensión estérica, permite que la bisagra se mueva cerca de la  $\beta$ -plegada y la tapa se posicione correctamente. Finalmente, la tapa interacciona con la base del nucleótido cíclico, la cual estabiliza su propia orientación y la de la bisagra, cubriendo así al nucleótido cíclico y protegiéndolo del disolvente circulante (Rehmann *et al.*, 2007).



**Figura 5. Cambios conformacionales inducidos a la unión al nucleótido cíclico del CNBD.** El esquema representa al núcleo central del dominio, el cual está formado por la estructura  $\beta$ -plegada (barril verde), así como el paquete de hélices amino terminal, la bisagra y la tapa (barras amarillas). **A** En ausencia del nucleótido cíclico, el PBC está posicionado de tal forma que la Leu (L) impide que entre un residuo de Phe (F) de la bisagra a una cavidad hidrofóbica. **B** Posterior a la unión del nucleótido cíclico (rojo) se forman puentes de hidrógeno (líneas punteadas) entre el PBC y el grupo fosfato (azul) del nucleótido. Esta conformación crea espacio para que el residuo de Phe y la bisagra se muevan hacia el núcleo del dominio. El movimiento de la bisagra aleja el paquete de hélices N-terminal (el movimiento es señalado por las flechas). **C** Finalmente, la nueva posición de la bisagra se estabiliza por las interacciones hidrofóbicas (líneas rojas punteadas) de la tapa con la base del nucleótido cíclico (Modificado de Rehmann *et al.*, 2007).

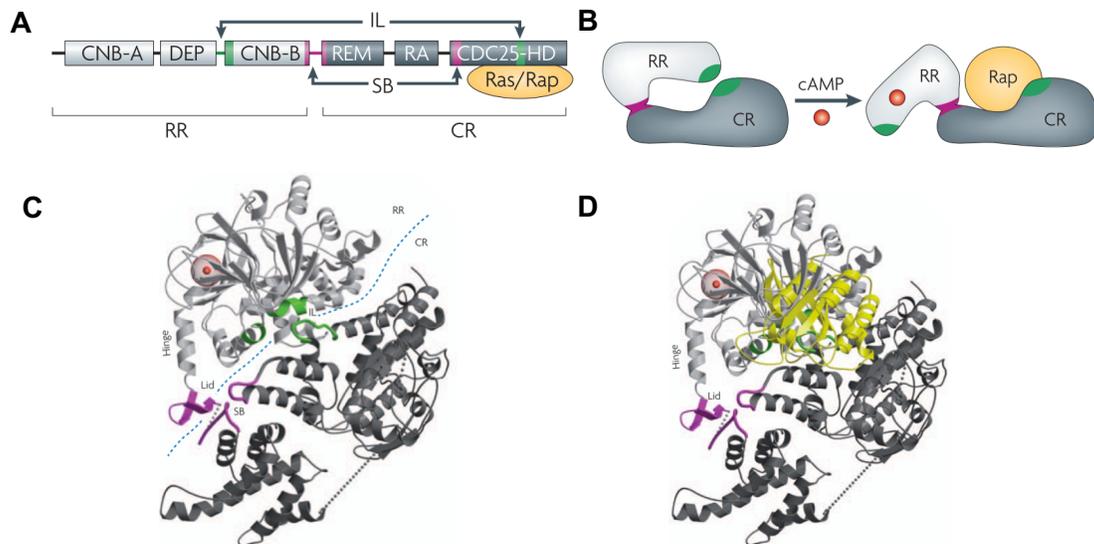
### EPAC (Proteína de intercambio activada directamente por AMPc)

La proteína EPAC, es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Al unirse con AMPc activa proteínas G, llamadas Rap1 y Rap2 (Dremier *et al.*, 2003). La proteína Rap está implicada en la regulación de diferentes procesos, incluyendo la adhesión celular mediada por integrina, la formación de unión celular mediada por cadherina, la polaridad celular e incluso la secreción. Hasta el momento se conocen dos variantes de EPAC: EPAC1, la cual presenta altos niveles de expresión en el corazón, los vasos sanguíneos, el útero, los riñones y el sistema nervioso central, y EPAC2, con estructura de dominio similar a EPAC1 y altos niveles de expresión en glándulas suprarrenales y el páncreas endocrino (Lezoualc'h *et al.*, 2016).

La proteína EPAC, consta de una región regulatoria en la parte N-terminal y una región C-terminal catalítica. EPAC1 tiene un dominio *Dishevelled Egl-10 Pleckstrin* (DEP) seguido por un solo dominio CNBD, a diferencia de EPAC2 que consta de dos dominios CNBD (Fig. 6A). Las regiones catalíticas contienen un dominio con el motivo de intercambiador de Ras (REM), un dominio asociado a Ras (RA) y un dominio homólogo a CDC25 (CDC25-HD). Este último es el dominio catalítico, y es suficiente para catalizar el intercambio de nucleótidos por los miembros de la familia Ras (Rehmann *et al.*, 2007).

La orientación relativa entre las regiones regulatorias y catalíticas, que es requerida para mantener el estado inactivo, está determinada por dos puntos de contacto conocidos como el cierre iónico (IL) y el tablero de interruptores (SB) (Fig. 6B). El cierre iónico es formado por interacciones iónicas entre los residuos de CDC25-HD y el paquete helicoidal N-terminal del segundo CNBD. El tablero de interruptores es creado por la tapa del segundo CNBD que forma una estructura  $\beta$ -plegada con residuos del dominio REM y CDC25-HD (Rehmann *et al.*, 2007).

La descripción de los estados unidos a ligando y libres de ligando de los CNBD podría dar la impresión de dos estados estáticos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la conformación activa y la inactiva existen en un equilibrio dinámico que está regulado por la unión del ligando (Fig. 6C,D) (Rehmann *et al.*, 2007).



**Figura 6. Estructura y regulación de EPAC.** **A** Estructura del polipéptido EPAC2, que se divide en una región regulatoria (RR) con los dos CNBD (A y B) y DEP, así como la región catalítica (CR) conformada por el dominio CDC25-HD, REM y RA. **B** Se observa que en el estado inactivo se presentan los puntos de contacto entre el RR y el CR, los cuales forman el cierre iónico (IL) y el tablero de interruptores (SB) que se resaltan en verde y magenta, respectivamente. Al unirse el AMPc, el dominio CDC25-HD interacciona con Ras. **C** Se muestra EPAC2 en su conformación inhibida. El borde estructural entre el RR y el CR se indica mediante una línea azul discontinua. La esfera roja indica el sitio de unión a AMPc en el segundo dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNB). Las líneas discontinuas grises indican las posiciones aproximadas de las conexiones en regiones flexibles de la estructura. **D** Se representa la unión de Ras (estructura amarilla) (Rehmann *et al.*, 2007).

## II. ANTECEDENTES

### Ensayo de unión tipo FRET

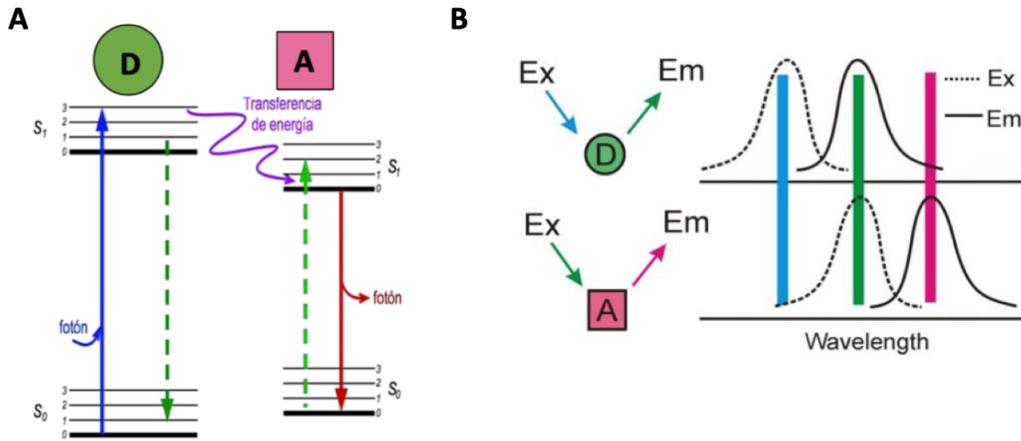
FRET (del inglés *Förster Resonance Energy Transfer*) es un fenómeno cuántico, en el cual ocurre transferencia de energía mediante resonancia de forma no radiativa a partir de un fluoróforo en estado excitado (llamado donador) a otro fluoróforo en su estado basal (llamado aceptor) por medio del acoplamiento intermolecular dipolo-dipolo de amplio alcance (Sekar, 2003) (Fig. 7).

A diferencia de la transferencia de energía radiativa, en el caso de FRET, no involucra la emisión o absorción de un fotón, sino que involucra a un fluoróforo como dipolo oscilante que puede intercambiar energía con otro dipolo con una frecuencia de resonancia similar (Lakowicz, 2006).

El proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de la luz es ilustrado por el diagrama de Jablonski (Fig. 7A). El estado energético de átomos y moléculas está determinado por la distribución de sus electrones en órbitas. Los fluoróforos pueden existir en varios niveles de energía vibracional en cada uno de los niveles de energía. En el estado basal ( $S_0$ ) los electrones están distribuidos en el nivel orbital y vibracional más bajo. Cuando un fluoróforo absorbe la luz (fotones) de una longitud de onda adecuada, ocurre una transición de electrones de fluoróforos a un nivel energético más alto ( $S_1$ ,  $S_2$ , etc.), denominado como estado excitado (Lakowicz, 2006). Sin embargo, el estado excitado no es estable, por lo que tiene una tendencia a regresar al estado basal (Nishigaki & Treviño, 2012).

Al regresar al estado basal, se pierde el exceso de energía; algunas moléculas lo pierden en forma de calor, en cambio otras por medio de la emisión de luz, dando como resultado el fenómeno de fluorescencia (Lakowicz, 2006). Es importante resaltar que la longitud de onda de la luz emitida es más larga que la longitud de onda de luz absorbida porque la molécula excitada siempre pierde parte de su energía en el estado excitado antes de emitir la fluorescencia (Abramowitz, sin fecha).

Las propiedades espectroscópicas que se tienen que considerar en la selección de los fluoróforos como pares FRET son las siguientes: 1) el espectro de emisión del donador debe sobrelapar con el espectro de excitación del aceptor (>30%) (Sekar, 2003), 2) la distancia entre los fluoróforos debe de ser menor a 10 nm y 3) los dipolos de transición del donante y el aceptor deben de estar orientados entre sí (Nishigaki & Treviño, 2012). De manera preferente, que el donador del par FRET tenga un alto rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) (Lakowicz, 2006), es decir, que exista una alta relación entre los fotones que emiten fluorescencia, respecto al número total de fotones excitados.



**Figura 7. Características de FRET.** **A** Diagrama de Jablonski. Ilustra 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, verde) y al aceptor (A, rosa) en un par FRET, en donde 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 aceptora alcanza 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). **B** Representación de los espectros de excitación y emisión del donador y aceptor. El espectro del donador se muestra de color azul, el espectro de emisión de color verde, que a su vez debe de sobrelaponearse con el espectro de excitación del aceptor para que se presente FRET. El espectro de emisión del aceptor se indica de color rosa (Modificado de Nishigaki & Treviño, 2012).

El fenómeno de FRET no requiere que el cromóforo de la proteína aceptora sea fluorescente. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones, tanto el donador como el aceptor son fluorescentes, y la aparición de transferencia de energía se manifiesta a través de la disminución de la eficiencia cuántica ( $\Phi_D$ ) y el decremento del tiempo de vida media del donador ( $\tau_D$ ), por lo tanto, se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia del donador, acompañada también de un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor (Sekar, 2003). En el caso de que la molécula aceptora sea también un fluoróforo, 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). Por lo tanto, el monitoreo de la intensidad de FRET permite determinar interacciones moleculares mediante el uso de fluoróforos que se encuentren unidos a las proteínas o moléculas de interés (Nishigaki & Treviño, 2012).

Es posible medir la velocidad de transferencia de energía ( $K_T$ ) mediante la siguiente fórmula:

$$K_T = K_D \left( \frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 = \frac{1}{T_D} \left( \frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad (1)$$

Donde  $K_D$  es la constante de decaimiento del donador en su estado excitado y es el inverso a  $\tau_D$ , que es el tiempo de vida media del donador en ausencia del aceptor. El término  $R_0$  (radio Förster) es la distancia en la cual la mitad de la energía de excitación del donador es transferida al aceptor, normalmente es de 3-6 nm,  $R_{DA}$  es la distancia entre el donador y el aceptor (Lakowicz, 2002).

Una vez obtenida la velocidad de transferencia es posible calcular la eficiencia ( $E$ ) de la transferencia de energía mediante la fórmula (2). La  $E$  que indica la fracción de fotones que son absorbidos por el donador y que son transferidos al aceptor.

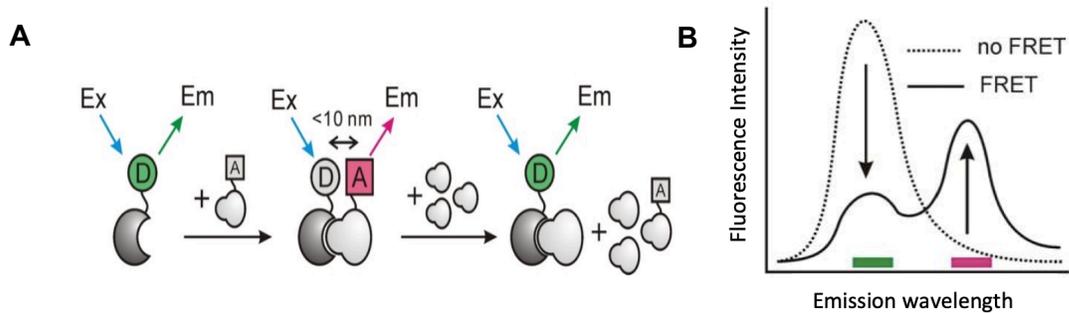
$$E = \frac{K_T}{K_T + K_D} \quad (2)$$

De manera experimental, la eficiencia de FRET se obtiene del cociente de la intensidad de fluorescencia del donador en presencia ( $F_{DA}$ ) y ausencia del aceptor ( $F_D$ )

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (3)$$

La eficiencia de FRET es proporcional a  $r^{-6}$  ( $r$ =distancia entre los dos fluoróforos), indicando una alta dependencia a la distancia entre las dos moléculas. Es por eso que esta técnica puede proporcionar una medida precisa de la proximidad molecular en Angstrom (10-100 Å) (Nishigaki & Treviño, 2012).

De manera frecuente, la luz de excitación del donador excita al aceptor directamente. En este caso, se observa la emisión de fluorescencia del aceptor sin el proceso de FRET. A este fenómeno se le conoce como excitación cruzada. Una forma de comprobar si la fluorescencia del aceptor es consecuencia de una interacción específica y no por excitación cruzada es mediante la realización de un ensayo de unión en la presencia de una alta concentración de competidor no fluorescente (Fig. 8A) (Romero *et al.*, 2017; Santana-Calvo *et al.*, 2018). Cuando el competidor no fluorescente desplaza al ligando fluorescente, provocará que la intensidad de fluorescencia del donador se recupere al no haber transferencia de energía (Fig. 8B).

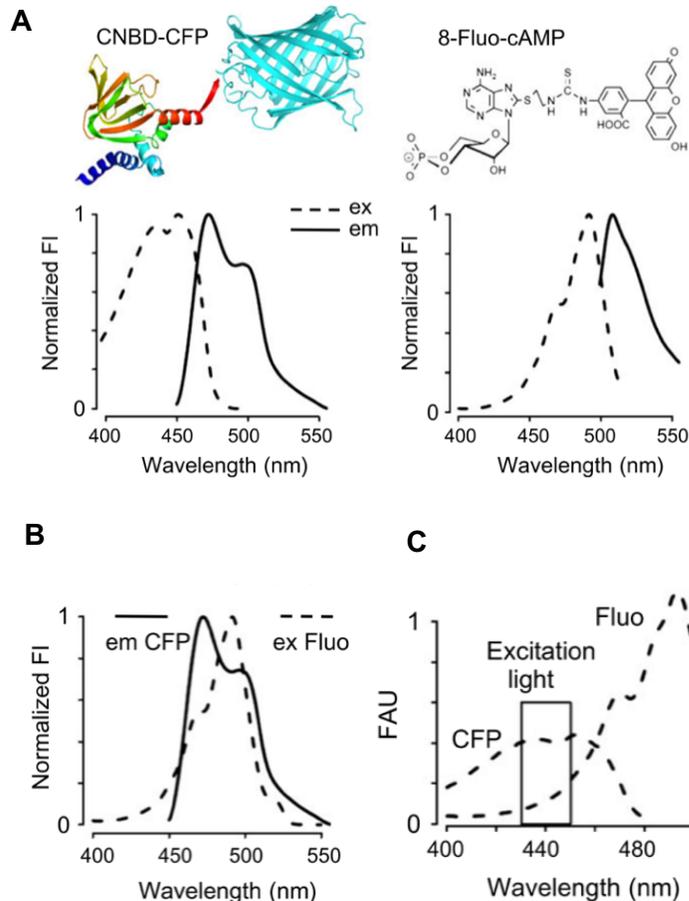


**Figura 8. Ensayo de competencia para comprobar FRET.** **A** Esquema de FRET y ensayo de competencia. Se muestra que cuando el aceptor no se encuentra lo suficientemente cerca, al excitar al donador, presenta una  $\lambda_{Em}$  de color verde. En cambio, al encontrarse un aceptor con la distancia suficiente ( $<10\text{ nm}$ ), el par emitirá la  $\lambda_{Em}$  del aceptor (color rosa). Al adicionar el competidor no fluorescente con una concentración excesiva comparada al aceptor fluorescente, se desplazará el aceptor y se unirá el competidor al aceptor, por lo tanto, la  $\lambda_{Em}$  se presentará de color verde. **B** Espectros de fluorescencia cuando hay o no transferencia de energía. En caso de FRET el pico del donador disminuye y el aceptor aumenta (trazo negro sólido), en cambio, cuando no hay FRET o posterior a un ensayo de competencia el pico del donador aumenta y el del aceptor disminuye (trazo negro punteado) (Modificado de Nishigaki & Treviño, 2012).

### Antecedentes de ensayo de unión tipo FRET entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc

Romero y colaboradores (2017) estudiaron la interacción molecular entre un CNBD y AMPc mediante un ensayo de unión tipo FRET *in vitro* entre un análogo fluorescente de AMPc marcado con fluoresceína (8-Fluo-AMPc) y un CNBD recombinante de EPAC1 de humano marcado con la proteína fluorescente cian (CFP) (Fig. 9A).

El espectro de excitación de 8-Fluo-AMPc y el espectro de emisión de CFP, se superponen lo que favorece las altas eficiencias de FRET entre dos fluoróforos (Fig. 9B). Sin embargo, el aceptor 8-Fluo-AMPc es ligeramente excitado por la luz de excitación (440nm) usada para el ensayo, por lo tanto, presenta excitación cruzada (Fig. 9C).

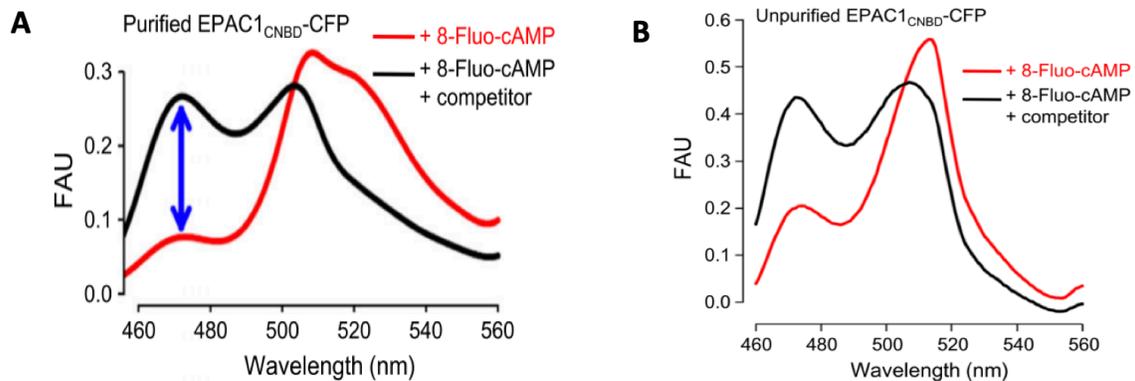


**Figura 9. Características del par FRET CNBD-CFP como donador y 8-Fluo-AMPC como aceptor.** **A** Espectro de emisión y de excitación del donador CNBD-CFP y del aceptor 8-Fluo-AMPC. **B** se muestra el traslape de los espectros de emisión del donador con el de excitación del aceptor. En el panel **C** se observa la región de los espectros (rectángulo) en donde se presenta excitación directa del aceptor por la  $\lambda_{Ex}$  del donador, por lo tanto, hay excitación cruzada. Unidades Arbitrias de Fluorescencia (FAU, por sus siglas en inglés). (Romero, *et al.*, 2017).

Para la comprobación de FRET, implementaron el uso de un competidor con mayor concentración que el aceptor, de manera que al haber mayor unión entre el donador y competidor se espera que la intensidad de la fluorescencia del donador (el primer pico de emisión) se recupere. Como se muestra claramente en el espectro (Fig. 10A), la intensidad de la CFP fue menor en ausencia del competidor, indicando que se produjo alto nivel de FRET entre CFP y fluoresceína. Esto demuestra la unión específica entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP y 8-Fluo-AMPC.

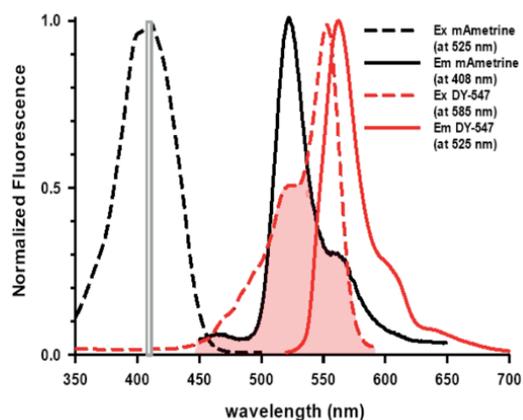
Posteriormente, realizaron el mismo ensayo de unión usando proteína no purificada (Fig. 10B), es decir el extracto soluble de la bacteria que contiene proteínas endógenas además de EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP. La eficiencia de FRET fue menor que en EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP purificada,

probablemente por la interferencia de proteínas endógenas que interactúan con AMPc, así como la degradación parcial de EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP. A pesar de presentar una pequeña reducción de FRET, se puede concluir que la técnica de FRET es funcional aún cuando la proteína no este purificada. Con base en las evidencias anteriores, los autores concluyen que se pueden realizar ensayos de unión en células vivas para medir interacciones entre moléculas.



**Figura 10. Espectro de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP (donador) y 8-Fluo-AMPc (aceptor).** **A** El espectro de fluorescencia de 100 nM de EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP + 200 nM de 8-Fluo-cAMP en presencia (línea negra) o ausencia (línea roja) de exceso de competidor (10  $\mu$ M 8-CPT-AMPc). La línea azul evidencia que ocurrió FRET en esta condición. **B**. El mismo ensayo de unión con las mismas concentraciones del donador, aceptor y competidor en proteína no purificada. La intensidad de fluorescencia se muestra en unidades arbitrarias de fluorescencia (FAU) (Romero, *et al.*, 2017).

Para resolver el problema de excitación cruzada, Santana-Calvo y colaboradores (2018) realizaron un par FRET usando EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-[DY-547]-AET-AMPc, como donador y aceptor respectivamente (Fig. 11). La proteína fluorescente mAmetrine se caracteriza por tener un corrimiento de Stokes largo (Ai *et. al.*, 2008), es decir, presenta una distancia larga entre los picos de excitación y emisión. El nivel de excitación de 8-[DY-547]-AMPc alrededor de la luz de excitación del donador (408nm) es casi cero, lo que sugiere que la excitación cruzada del aceptor es despreciable durante el ensayo de unión basado en FRET.



**Figura 11. Espectro de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine (donador) y 8-[DY-547]-AMPC (aceptor).** En el espectro de fluorescencia de este par FRET, es posible ver el corrimiento de Stokes largo de la proteína mAmetrine, donde se marca una distancia considerable entre el pico del espectro de excitación (línea gris del trazo negro punteado) y el pico del espectro de emisión (trazo negro continuo). Además, se observa que el par FRET no presenta excitación cruzada, ya que los espectros de emisión del donador y el aceptor, no se sobreponen. En el caso del aceptor 8-[DY-547]-AMPC, el pico de su espectro de excitación (trazo rojo punteado) corresponde a 550 nm, el pico de emisión (trazo rojo continuo) corresponde a 585 nm. Las  $\lambda_{Em}$  y  $\lambda_{Ex}$  que se indican en la figura son los valores que se fijan en el espectrofluorómetro para obtener el espectro indicado (Santana-Calvo *et al.*, 2018).

## Proteína fluorescente mAmetrine1.2

La proteína fluorescente mAmetrine1.2 es una variante de la proteína GFP, obtenida mediante evolución de proteínas de forma dirigida (Ai *et al.*, 2008). Es importante recalcar que existen diversas variantes, en el presente trabajo se utilizó la proteína mAmetrine1.2, ya que presenta mayor fotoestabilidad que mAmetrine (Ding *et al.*, 2011).

La proteína fluorescente mAmetrine1.2, se caracteriza por poseer diversas propiedades como excitarse con luz ultravioleta ( $\lambda_{Ex}=408$  nm) en su estado basal ya que el cromóforo se encuentra protonado, emitir en color amarillo ( $\lambda_{Em}= 525$  nm) debido a la transferencia de protones en su estado excitado (ESPT, por sus siglas en inglés) así como las interacciones  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento con el cromóforo, y, además, presentar una alta eficiencia cuántica. Estas condiciones le confieren a la proteína un corrimiento de Stokes largo (Ai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011), lo cual ayuda a reducir el fenómeno de excitación cruzada en un ensayo FRET.

Dichas propiedades clasifican a mAmetrine como un donador potencial (Tabla 1). Anteriormente, esta proteína se ha utilizado en ensayos de FRET como donador junto con una proteína fluorescente roja, tdTomato (Ai *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011), así como con el colorante fluorescente rojo 8-[Dy-547]-AMPC (Santana-Calvo *et al.*, 2018) como aceptores.

Tabla 1. Propiedades de la proteína fluorescente mAmetrine1.2

Proteína	Ex $\lambda_{\max}$ (nm)	Em $\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M $^{-1}$ cm $^{-1}$ )	$\Phi$
mAmetrine1.2	408	525	31,000	0.59

### Análogos fluorescentes de AMPc

#### 8-[Dy-547]-AMPc

El colorante 8-[Dy-547]-AMPc, fue sintetizado por Kusch y colaboradores (2007) para estudiar la regulación mediada por la unión de AMPc a los CNBD del canal HCN2. Posteriormente, se utilizó como aceptor en un par FRET por Santana-Calvo y colaboradores (2018) para determinar la unión entre AMPc y un CNBD de la proteína EPAC. Fue elegido por sus características espectroscópicas similares a tdTomato, con un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) alto. Además, su espectro de excitación se sobrepone con el espectro de emisión de mAmetrine1.2, sin presentar excitación cruzada (Santana-Calvo *et al.*, 2018), por lo que lo hace un buen aceptor en un par FRET. Sin embargo, tiene como desventaja una baja eficiencia cuántica ( $\Phi$ ) (Tabla 2).

#### 8-Rodamina6G-AMPc

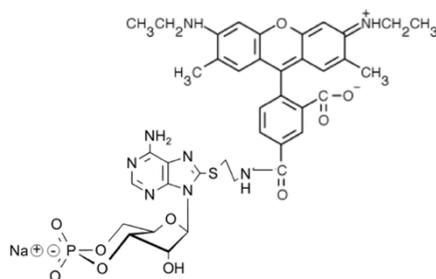


Figura 12. Estructura química de 8-Rodamina6G-AMPc.

El análogo fluorescente de AMPc llamado 8-Rodamina6G-AMPc (Fig. 12) se sintetizó en el laboratorio del Dr. Nishigaki (2017), con la finalidad de utilizarlo como un aceptor de la proteína mAmetrine1.2 y que fuera capaz de ser permeable a la membrana.

Debido a las propiedades espectroscópicas de 8-Rodamina6G-AMPc (Tabla 2), es un colorante potencial para usarse como aceptor, ya que presenta ventajas sobre otros

fluoróforos, como mayor coeficiente de extinción molar en comparación a tdTomato y 8-[Dy-547]-AMPc, su pico de excitación (530 nm) se encuentra más cercano al pico de emisión de mAmetrine (525 nm) a diferencia de tdTomato (554 nm) y 8-[Dy-547]-AMPc (557 nm). Además, presenta un valor alto en brillo (coeficiente de extinción molar x eficiencia cuántica) (Cranfill *et al.*, 2016), por lo tanto, se espera que al realizar el ensayo de FRET, se observe mayor incremento de fluorescencia en el pico correspondiente a 8-Rodamina6G-AMPc en comparación a 8-[Dy-547]-AMPc.

**Tabla 2. Propiedades espectroscópicas de los análogos fluorescentes, aceptores de mAmetrine**

Donadores	$E_{x\lambda_{max}}$ (nm)	$E_{m\lambda_{max}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\Phi$	Brillo ( $\times 10^{-3} M^{-1}cm^{-1}$ )
tdTomato	554	581	138,000	0.69	95.2
8-[Dy-547]-AMPc	557	574	150,000	0.2	30
8-Rodamina6G	530	555	116,000	0.9	104.4

### III. JUSTIFICACIÓN

El CNBD representa un blanco principal de los nucleótidos cíclicos en el citoplasma de las células vivas tanto procariontas como eucariotas. Por medio del alineamiento múltiple de secuencias de CNBD se identificaron aminoácidos claves que permiten la unión específica con los nucleótidos cíclicos. Sin embargo, existen CNBD funcionales que no cuentan con dichos aminoácidos como PDZ-GEF (Rapgef2). Por lo anterior, los análisis bioinformáticos no son suficientes para predecir la actividad real de los CNBD predichos.

El ensayo de unión *in vitro* tipo FRET es una técnica sensible para determinar la interacción entre los CNBD y nucleótidos cíclicos. Para lograr dicho ensayo es necesario purificar los CNBD de las proteínas de interés. Sin embargo, existen proteínas inestables *in vitro*, un ejemplo es el CNBD del sNHE, el cuál no se ha logrado purificar debido a que la proteína quimérica forma cuerpos de inclusión posterior a la purificación (Romero, 2018). A pesar de que no fue posible obtener la purificación se logró expresar la quimera en un sistema eucarionte. Esto sugiere que el CNBD del sNHE posiblemente requiere del ambiente citoplasmático para mantenerse estable y desarrollar su debida conformación.

Además, existen múltiples familias de proteínas recién identificadas que poseen CNBD tanto en procariontes como en eucariotes y aún no se han caracterizado. Es probable que algunos de los CNBD funcionales de las proteínas nuevas requieran del ambiente citoplasmático para manifestar la función real de los CNBD.

Por lo anterior, es importante establecer un ensayo de unión *in vivo* de manera directa y confiable para determinar la actividad de CNBD predichos que no son estables *in vitro* en condiciones fisiológicas.

## IV. HIPÓTESIS

Mediante la técnica de FRET *in vivo* se logrará determinar la interacción molecular en tiempo real entre el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) de EPAC1 y AMPc.

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterización de la interacción molecular en tiempo real entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) y AMPc en el citoplasma de células eucariotas mediante un ensayo de unión tipo de FRET.

### Objetivos particulares

1. Evaluación de un análogo fluorescente de AMPc (8-Rodamina6G-AMPc) como un aceptor FRET en el ensayo de unión a EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2
  - 1.1 Expresión y purificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en *E.coli*
  - 1.2 Determinación de la  $K_d$  entre 8-Rodamina6G-AMPc y EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2
  - 1.3 Determinación del nivel de excitación cruzada entre 8-Rodamina6G-AMPc y EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2
  
2. Evaluación de 8-Rhodamina6G-AMPc como aceptor en un ensayo de unión *in vivo*
  - 2.1 Construcción de un plásmido (pcDNA3.1(-)Pro) para expresar EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en el citoplasma de HEK293
  - 2.2 Construcción de un plásmido control (pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R297E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2)
  - 2.3 Expresión de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en HEK293
  - 2.4 Ensayo de unión *in vivo* (citoplasma de HEK293) por imágenes fluorescentes
  - 2.5 Evaluación de la permeabilidad de 8-Rhodamina6G-AMPc en la membrana plasmática.
  
3. Evaluación de un ensayo de unión *in vivo* mediante fluorometría de *patch clamp*

- 3.1 Construcción de un plásmido que expresa EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en la membrana de células eucariotas (pcDNA3.1(-)PalMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2)
- 3.2 Construcción de un plásmido de control (pcDNA3.1(-)PalMyr-EPAC1R297E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2)
- 3.3 Expresión de PalMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en HEK293 y confirmación de su localización por microscopía confocal.
- 3.4 Ensayo de unión en citoplasma de HEK293 por fluorometría de *patch clamp* usando 8-[DY547]-AMPC y 8-Rodamina6G-AMPC.

## VI. MÉTODOS

### Purificación y cuantificación de la proteína EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2

Se expresó la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 a partir de pRSET-B controlada por el promotor T-7 en células competentes de la bacteria *E. coli* BL21(DE3) (*Invitrogen*). El uso del plásmido pRSET-B se debe al buen nivel de expresión, su origen de replicación es derivado de pUC, por lo que es un plásmido de alto número de copias (500-700 copias/célula) (Lin-Chao *et al.*, 1992).

Se inoculó una colonia en 250 mL de LB líquido con ampicilina (100 µg/mL) y se dejó crecer el cultivo a 20 °C en agitación durante 60 horas sin inducción de IPTG (Heim *et al.*, 1994) evitando la exposición a la luz.

Posteriormente el cultivo se pasó a tubos cónicos de 50 mL (Falcon™) para poder centrifugar a 1500 g a 4 °C por 20 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de solución 1 (Tris-HCl 10 mM + 150 mM NaCl+ cOmplete 1x) (*Roche*).

Para la obtención de un extracto libre de células, las células en suspensión se sonicaron con 3 pulsos de 30 segundos a 40 Hertz (Hz) durante 3 minutos de descanso en hielo. Todos los tubos se centrifugaron a 20,000 g a 4 °C durante 20 minutos, recuperando únicamente la proteína soluble.

La proteína quimérica tenía una etiqueta de 6 histidinas en su extremo amino, la cual se empleó para su purificación por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA agarosa. Se procedió a montar la columna manteniéndola cerrada con una tapa en la base, se le agregó 3 mL de solución 1.

Posteriormente se metió un tapón de algodón hasta la base de la columna y se agregó 1 mL de Ni-NTA Superflow (Qiagen), el cual contiene resina de Ni<sup>2+</sup> con etanol, una vez que la resina de Ni<sup>2+</sup> se asentó, se procedió a quitar la tapa de la base de la columna con el fin de permitir el flujo del etanol y se dejó el volumen mínimo para no secar la resina, posteriormente se equilibró con 3 mL de solución 1, y nuevamente se dejó salir, evitando que la columna se seque.

Se añadió el extracto libre de células preparado a la columna equilibrada y se procedió al lavado agregando 500 µL de solución 2 (Tris-HCl 10 mM + 150 mM NaCl + 50 mM Imidazol) para eliminar el pegado inespecífico. Finalmente, la elución se realizó agregando 3 mL de solución 3 (Tris-HCl 10 mM + 150 mM NaCl + 250 mM Imidazol) recuperando la proteína de interés.

Es importante realizar todos los pasos manteniendo los tubos y las soluciones en hielo y cubiertos para evitar la exposición a la luz.

Una vez purificada la proteína EPAC<sub>1</sub>C<sub>NBD</sub>-mAmetrine1.2, se procedió a medir la concentración mediante la ley de Beer-Lambert a su pico máximo (405 nm) usando la fórmula (4):

$$A = \epsilon bc \quad (4)$$

Donde:

A es absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la proteína, b es longitud de paso óptico (1 cm) y c es la concentración de la muestra en unidades de mol/L.

La absorbancia se midió en el pico máximo de EPAC<sub>1</sub>C<sub>NBD</sub>-mAmetrine1.2 en el NanDrop<sup>TM</sup>2000 utilizando 1.5 µL de la muestra y la solución 1 como blanco.

En la literatura se especifica el  $\epsilon$  de mAmetrine1.2 corresponde a 31,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Ding, Ai, Hoi, & Campbell, 2011).

Se confirmó el tamaño y la integridad de la proteína EPAC<sub>1</sub>C<sub>NBD</sub>-mAmetrine1.2 mediante un gel de acrilamida SDS-PAGE 12% donde se observa una única banda del peso molecular esperado (~47 kDa) en los carriles correspondientes a la fracción purificada (Fig. S1).

## Ensayo de unión tipo FRET *in vitro* entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC

### Ensayo *in vitro* en el espectrofluorómetro

Los ensayos de unión tipo FRET *in vitro* se realizaron entre el donador EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y el aceptor 8-Rodamina6G-AMPC con una estequiometría 1:2 respectivamente con buffer (Tris-HCl 10 mM + 150 mM NaCl, pH7.4) en un volumen final de 250  $\mu$ L.

Se realizaron diluciones secuenciales usando como factor de dilución 3.16 ( $\sqrt{10}$ ), partiendo de una concentración del donador de 1  $\mu$ M hasta 1 nM (1,000 nM, 316 nM, 100 nM, 31.6 nM, 10 nM, 3.16 nM, 1 nM)

Se registraron los espectros de excitación y emisión en un espectrofluorómetro Olis Aminco SLM 8000, usando una longitud de luz de excitación de 405 nm. Se hizo un barrido espectral en un rango de 490 a 625 nm. Las intensidades de fluorescencia eran diferentes dependiendo de la concentración de las muestras, por lo tanto, se modificó el voltaje del fotomultiplicador para evitar saturación y mejorar la señal/ruido de cada trazo.

También se midió la señal basal del medio, que no es despreciable en las muestras diluidas, y obtuvimos las señales de fluorescencia neta por sustracción de fondo.

En todas las diluciones se agregó 0.1% de BSA para evitar uniones inespecíficas y el buffer para aforar al volumen final.

Los espectros de fluorescencia del ensayo FRET se graficaron por concentración, se midió la señal basal del buffer y se obtuvieron las señales de fluorescencia neta restando la señal basal. Las gráficas se realizaron con el *software* R.

### Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC

Se realizó un ensayo de unión con 100 nM del donador y 200 nM del aceptor en presencia y ausencia del competidor 8-CPT-AMPC a una concentración de 200  $\mu$ M (1,000 veces más que el aceptor), con 0.1% de BSA. A los espectros obtenidos se les restó la fluorescencia basal del buffer (fondo) para conseguir la fluorescencia absoluta. Se procedió a graficar

ambos espectros de fluorescencia en una gráfica y se tomó el punto de intersección de ambas curvas, dicho valor correspondió al punto isobéptico.

Posteriormente, se normalizaron los datos a partir del punto isobéptico y se calculó el valor de la  $K_d$  (5), considerando que el complejo ligando-receptor tiene una relación lineal con el cociente entre el pico máximo del aceptor y donador con el competidor y el punto isobéptico (Romero *et al.*, 2017; Santa-Calvo *et al.*, 2018).

$$\frac{-F}{F} = \alpha = \frac{3x+k_d-\sqrt{(3x+k_d)^2-8x^2}}{2x} + \beta \quad (5)$$

Donde:

F es el pico máximo del aceptor y donador con competidor,  $F_0$  es el punto isobéptico, x es la concentración total de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, las constantes  $\alpha$  y  $\beta$ , permiten ajustar los datos.

En todos los datos se le restó la señal basal del buffer, obteniendo las señales de fluorescencia neta. Se realizó un código en el lenguaje de programación R para el análisis y visualización de los datos.

#### Espectros de fluorescencia de 8-Rodamina6G-AMPC

Los datos de los espectros de fluorescencia se adquirieron en un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000, utilizando una lámpara de xenón.

Para obtener los espectros de emisión de 8-Rodamina6G-AMPC, en el espectrofluorómetro se fijó la longitud de onda de excitación a 530 nm y 408 nm. De igual forma, se midió la señal basal del buffer y se obtuvieron las señales de fluorescencia neta restando la señal basal. Se realizó un código en el lenguaje de programación R para la visualización de los espectros a partir de los datos obtenidos, donde se determinó el porcentaje de excitación cruzada mediante  $(FI_{408})/(FI_{max})$ .

#### Construcción de plásmidos

##### Construcción de los plásmidos pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2

Para el diseño de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (Fig. S4) se utilizó como vector base a pcDNA3.1(-)Pro. Este vector permite la expresión tanto en células eucariotas como procariontas, por lo tanto, permite la expresión de EPAC1<sub>CNBD</sub>-

mAmetrine1.2 en *E. coli* y en células HEK293. Además, el usar la proteína fluorescente mAmetrine1.2 facilitó la selección de colonias positivas por medio del color. Para realizar la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 partimos del plásmido pcDNA3.1(-)Pro-mCherry (Apéndice 1), por lo tanto, esta estrategia permitió de manera sencilla seleccionar las colonias positivas (amarillas) a las negativas (rojas).

Se realizó la amplificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 por PCR a partir de pRSET-B EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 siguiendo el protocolo y empleando los reactivos descritos en las tablas suplementarias S1 y S2.

Para insertar el gen que codifica a la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en el vector, se le añadieron los sitios de restricción *NheI* en el extremo 5' y *HindIII* en el extremo 3', mediante el par de oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio (Tak 103F y Tak 46R) (Tabla S7) logrando insertar dichos sitios de restricción en la secuencia pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE con bromuro de etidio (BrEt) para verificar el tamaño del amplicón obtenido en el PCR.

Al confirmar el fragmento del tamaño esperado, se purificó empleando el sistema *DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y se cuantificó la concentración del fragmento por espectrofluorometría (*Nanodrop 2000, Thermo Scientific*). Posteriormente, se realizó una doble digestión del fragmento y del plásmido pcDNA3.1(-)Pro-mCherry utilizando las enzimas de digestión *Fast Digest NheI* y *HindIII* (*Thermo Scientific*). Se incubaron las digestiones a 37 °C durante 1 hora.

Una vez realizada la doble digestión, ambos productos se purificaron, el vector a partir de un gel de agarosa, así como el inserto empleando los sistemas *Gen JET Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*) y *DNA Clean & Concentrator™* (*Zymo Research*) respectivamente, se cuantificó la concentración de cada producto por espectrofluorometría (*Nanodrop 2000, Thermo Scientific*).

Posteriormente se realizó la ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (*Thermo Scientific*) mediante los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción entre el vector pcDNA3.1(-)Pro y el inserto EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 con una relación molar 1:5 respectivamente. Al finalizar se incubaron a 22 °C durante 1 hora.

Finalmente se transformó el plásmido ligado en la cepa *E. coli* JM109(DE3) (proporcionada por *National Institute of Genetics*) y se sembraron en cajas con medio LB sólido suplementado con ampicilina (50 µg/mL). Después de 12 horas de crecimiento a 37 °C, se seleccionaron 2 colonias transformantes al azar (amarillas). Posteriormente se llevó a cabo la purificación de plásmido empleando el sistema *Plasmid Miniprep-Classical* (Zymo Research), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se confirmó la construcción mediante un patrón de digestión utilizando las enzimas *Bgl*III y *Bam*HI en un gel de agarosa.

Para confirmar la secuencia de EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 se utilizó un par de oligonucleótidos complementarios (*Forward*: Tak 07F y *Reverse*: Tak 18R) (Tabla S7) que flanquean al sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3.1(-)Pro, de tal forma que se secuenció el fragmento completo correspondiente a EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 con el apoyo de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, en el Instituto de Biotecnología.

Mutagénesis de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 mediante *QuikChange*

La técnica de mutagénesis se realizó con base en el protocolo *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* con algunas modificaciones para obtener la mutante pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, con un cambio de base de arginina (R) a ácido glutámico (E) en la posición 279 del dominio CNBD de la proteína EPAC1.

Para realizar dicha técnica se diseñaron los oligonucleótidos los cuales deben de ser complementarios parcialmente, es decir, que solo hibriden en la región 5'. De esta forma se evita la dimerización entre los oligonucleótidos a temperaturas elevadas (Zheng *et al.*, 2014). Por otra parte, las bases que se desean mutar se deben colocar a la mitad de la región complementaria de los oligonucleótidos.

Se utilizaron un par de oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio (*Forward*: Tak 225F y *Reverse*: Tak 226R) (Santana-Calvo *et al.*, 2016) (Tabla S7) para la realización del PCR siguiendo el siguiente protocolo (Tabla S3) y reactivos descritos en suplementarias (Tabla S4).

El DNA obtenido se purificó mediante el sistema *DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research) y se digirió con la enzima de restricción *Dpn*I (*Thermo Scientific*) (Tabla S5). Dicha enzima corta al DNA que se encuentra metilado, es decir, al templado parental. De esta forma quedará solo el DNA sintetizado, el cual contiene la mutación.

Una vez purificado el DNA mutado, se transformó, al igual que el control en células competentes de la cepa *E. coli* JM109(DE3) (proporcionada por *National Institute of Genetics*) y se sembraron en cajas con medio LB sólido. Posterior a las 12 horas de crecimiento a 37°C, se prosiguió a resembrar una colonia transformante en 3mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/mL) posteriormente se realizó la purificación del DNA plasmídico con el sistema *Plasmid Miniprep-Classical* (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para confirmar la secuencia de EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2 se utilizó un par de oligonucleótidos complementarios (*Forward*: Tak 07F y *Reverse*: Tak 18R) (Tabla S7) que flanquean al sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3.1(-)Pro. Se comprobó la mutación del cambio de aminoácido del fragmento EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2 con el apoyo de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, en el Instituto de Biotecnología.

Construcción de los plásmidos pcDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub> y pcDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2

Con el fin de obtener construcciones que se expresaran específicamente en la membrana plasmática, se utilizaron vectores que indujeron las señales postraduccionales de palmitoilación y miristoilación. Estas señales les confieren a las proteínas una fuerte unión a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas con la capa lipídica.

Para el diseño de las construcciones pcDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub> y pcDNA3.1(-)-PalmMyr-EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2 (Fig. S5) se utilizó como vector base pcDNA3.1(-)-PalmMyr.

Se realizó la amplificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y de la mutante EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2 por PCR como se describió anteriormente (Tabla. S.1) pero empleando en esta ocasión una DNA polimerasa de alta fidelidad Platinum Super Fi (*Thermo Scientific*) en la mezcla de los reactivos (Tabla. S6). Se amplificaron los fragmentos a partir de las construcciones previas pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R279<sub>ECNBD</sub>-mAmetrine1.2, empleando los oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio (*Forward*: Tak 103F y *Reverse*: Tak 202R) (TablaS7).

Los tamaños de los insertos obtenidos en el PCR se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE y se tiñó con bromuro de etidio (BrEt).

Posteriormente se realizó una doble digestión con las enzimas *NheI* y *XhoI* del plásmido pcDNA3.1(-)-PalmMyr-EYFP-EPAC2B-ECFP para obtener pcDNA3.1(-)-PalmMyr y de ambos productos amplificados (silvestre y mutante). La restricción se hizo inicialmente con la enzima *NheI*, posteriormente a las 2 horas de digestión se agregó la enzima *XhoI* dejando la incubación 2 horas más a 37 °C. Para la purificación del inserto se empleó el sistema *DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research), en el caso de la purificación del vector pcDNA3.1(-)-PalmMyr se corrió una electroforesis en gel de agarosa y se cortó la banda correspondiente al fragmento esperado posteriormente se empleó el sistema *GenJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific). Se determinó la concentración de cada producto por espectrofluorometría (*Nanodrop 2000*, Thermo Scientific).

Una vez purificados y cuantificados los fragmentos (mutante y silvestre) y el vector, se llevó a cabo la ligación de los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción. Ambas ligaciones se realizaron a una relación molar 1:5 del inserto y del vector respectivamente, tanto de la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 como de la variante EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. Se dejó en incubación a 37 °C durante toda la noche.

Posteriormente se transformó la ligación en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y al finalizar la purificación del DNA plasmídico implementando el sistema *Plasmid Miniprep-Classical* (Zymo Reserch), se realizó la digestión para verificar el patrón de digestión de las construcciones pcDNA3.1(-)ProEPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, pcDNA3-PalmMyr-EYFP-EPAC2B-ECFP, pcDNA3-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y pcDNA3-PalmMyr-EPAC1R279<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 con las enzimas *BamHI* y *HindIII*. Se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Finalmente, se corroboró la construcción de pcDNA3-PalmMyr-EPAC1-mAmetrine1.2 y pcDNA3-PalmMyr-EPAC1R279E-mAmetrine1.2 por secuenciación utilizando el oligonucleótido complementario (*Forward*: Tak 07F) (Tabla S7) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, en el Instituto de Biotecnología.

### Cultivo celular

Se mantuvo la línea celular HEK293 (proveniente de células embrionarias de riñón humano) en cajas Petri de 60 x 15 mm, con 3 mL del medio completo (ADMEN, por sus siglas en inglés, *Gibco, Introgen*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés, *Gibco, Introgen*) y 1% de antibiótico, a una temperatura de 37 °C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora VWR Scientific 2100.

Las células se sembraron cada 48 horas, después de haber alcanzado el ~70% de confluencia en una cámara de flujo laminar de acuerdo al siguiente protocolo: se aspiró cuidadosamente el medio de cultivo, se añadió 1 ml de buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, *Gibco, Invitrogen*) para el lavado de las células pegadas y se retira mediante succión, posteriormente se despegan las células con 1 mL de tripsina (TryPLE™ Express, *Gibco, Life Technologies*), se dejan incubado a 37 °C durante 1 min y se comprueba que se hayan despegado las células en el microscopio óptico invertido *Nikon Eclipse TS 100*. La reacción de la tripsina se bloqueó añadiendo 2 mL de medio completo (ADMEN), suplementado con FBS. Finalmente, se resuspendieron las células con la pipeta.

Para mantener la línea celular, se tomaron 500 µL de la suspensión, se colocó en una caja Petri de 35 mm con 5 mL de medio completo suplementado con % de antibiótico, se mezcló cuidadosamente con la pipeta y se dejó en la incubadora a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

El pase de las células para la posterior transfección se realizó a partir de 200 µL de la suspensión y se colocó en una caja Petri de 35 mm con fondo de vidrio. Después se agregó 500 µL de DMEM suplementado, de igual manera se mezcla cuidadosamente con la pipeta y se dejó en la incubadora a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Ensayo *in vivo* en microscopio confocal

Se utilizaron células HEK293 transfectadas con EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. Posteriormente, se observaron las células en el microscopio invertido (Zeiss Observer Z.1) en modo confocal de disco giratorio 3I Marianas (Yokogawa CSU-W1), con un objetivo de inmersión en aceite con apertura numérica N 40X/1.3. Se utilizó un láser de estado sólido bombeado con un diodo con una longitud de onda de 405 nm y los filtros de emisión de 525/30 y 542/27 para el registro de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. Para el registro de 8-Rhodamina6G-AMPC se utilizó un láser de estado sólido diodo con longitud de onda de 561 nm con el filtro de emisión de 671/73.

Se registró la fluorescencia de las células transfectadas con EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 durante 5 minutos previo a la adición de 8-Rodamina6G-AMPC y 15 minutos posterior a la adición.

Las imágenes de la fluorescencia obtenidas en los experimentos se analizaron con el paquete de procesamiento de imágenes ImageJ. Se evaluó la intensidad máxima de fluorescencia de las imágenes obtenidas mediante la realización de un ROI (región de interés, por sus siglas en inglés) de un grupo de células del campo. A estos datos se les restó

la fluorescencia basal del campo óptico (fondo) para conseguir la fluorescencia absoluta del grupo de células. Posteriormente, los cambios de fluorescencia fueron analizados mediante la normalización de la fluorescencia con la siguiente fórmula:

$$\Delta F = \frac{F}{F_0} \quad (7)$$

Donde:

F es el valor de la fluorescencia en cada tiempo y  $F_0$  la fluorescencia basal.

### Pruebas de permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC

Las células HEK293 se cargaron con 8-Rodamina6G-AMPC a una concentración de 10  $\mu$ M, durante 30, 90 y 120 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que transcurrió el tiempo de cargado correspondiente, se hizo un lavado con 1 mL de PBS para quitar el exceso de colorante fluorescente.

Finalmente, las células se observaron en el microscopio invertido de epifluorescencia (cell TIRF Illuminator; Olympus IX81) con un objetivo de inmersión en aceite Olympus UApo de apertura numérica N 60X/1.49 y un *binning* de 1. Se utilizó un láser de estado sólido bombeado con un diodo de 491 nm de longitud. La potencia láser máxima, medida en la parte posterior del plano focal del lente objetivo, oscilaba entre 20 y 25 mW. La selección del haz y la modulación de las intensidades del láser se controlaban a través del software. Se utilizó un conjunto completo de cubos láser multibanda para seleccionar las fuentes de luz, ya que se pretendía recoger todo el espectro de emisión de 8-Rodamina6G-AMPC, (Excitación 405/491/561/640 nm, emisión 446/510/581/703-25 nm y dicróico 405/488/532/635 nm). La luz fue captada mediante una cámara EMCCD (Andor IXON 888).

### Transfección de plásmidos en células eucariotas HEK293

La transfección se realizó en cultivos celulares HEK293 con 24 h post-pase y ~70% de confluencia, con base en el protocolo *PolyFect Transfection Reagent Handbook* (Qiagen) con diversas modificaciones.

En un tubo de microcentrífuga (Eppendorf™) de 2 mL se colocó 1 $\mu$ g de DNA de la construcción de interés. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L del reactivo PolyFect (Qiagen) y 100  $\mu$ L de medio OptiMEM sin suero (FBS) ni antibiótico. Se mezcló cuidadosamente con ayuda de la pipeta y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, al cultivo celular se le hizo cambio del medio con 2mL del OptiMEM suplementado con FBS y antibiótico. A continuación, se agregó al cultivo la reacción del tubo que contiene los complejos de transfección.

Las células transfectadas se incubaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas más previo al experimento.

### Ensayo *in vivo* con patch-clamp fluorometry

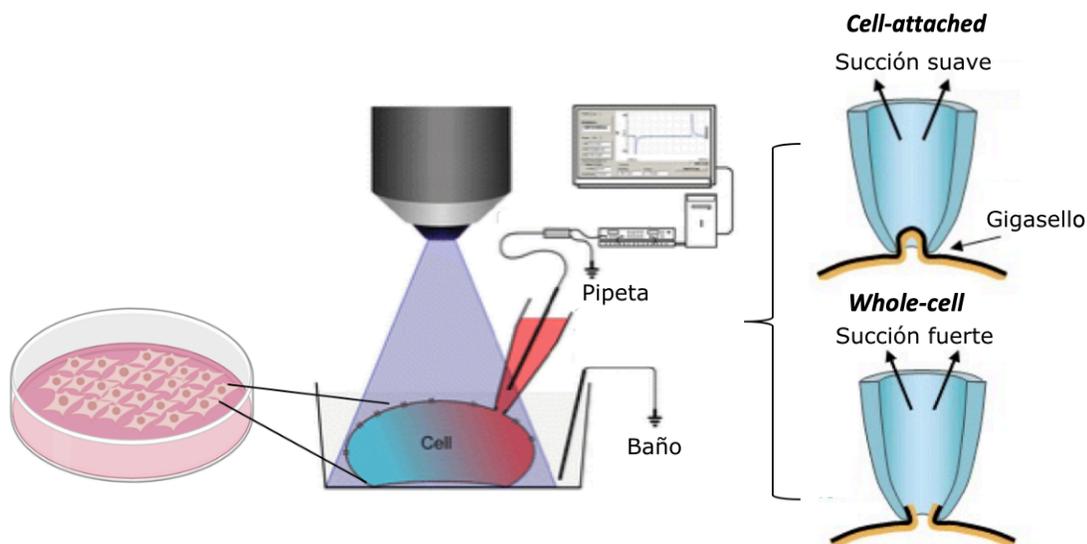
#### Técnica de *patch-clamp fluorometry*

El sistema *patch-clamp fluorometry* combina técnicas espectroscópicas y electrofisiológicas para detectar simultáneamente cambios conformacionales y corrientes iónicas a través de la membrana (Kusch & Zifarelli, 2014). Es decir, a partir de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) se utilizan técnicas de fluorescencia. Sin embargo, la aplicación de esta técnica se utilizó con otro enfoque innovador: el acceso al medio intracelular para introducir el colorante a la célula por medio de la pipeta con la posibilidad de seguir la intensidad de fluorescencia.

Para la realización del ensayo FRET se utilizó la técnica *patch-clamp fluorometry* en su modalidad célula completa (*whole-cell*) a partir de células que expresaban EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en la membrana citoplasmática.

La técnica de *patch-clamp* consiste en realizar un parche aislado a la membrana por medio de micropipetas con una baja resistencia eléctrica. En la configuración de célula adherida (*cell-attached*) se llena la micropipeta con una solución conductora, se pone en contacto con la superficie celular, y mediante una ligera succión implementando presión negativa se obtiene un sello con un valor de resistencia eléctrica superior a 1 G (gigasello), posteriormente se realiza la modalidad de *whole-cell* en donde se aplica una succión de mayor intensidad, de manera que la membrana en contacto con la boca de la pipeta se abra, permitiendo el intercambio entre el citoplasma y el líquido en la pipeta al interior de la célula. (Salceda & Soto, 2015) (Fig. 13).

Las soluciones empleadas para el registro tanto del baño como de la pipeta se describen en suplementarias (Tabla.S8). En la solución de la pipeta se utilizaron los aceptores 8-Rodamina6G-AMPC o 8-[Dy-547]-AMPC.



**Figura 13. Esquema representativo de la técnica de *patch clamp fluorometry*.** A partir de un cultivo celular que se encuentra en solución de baño se realiza un parche en la membrana mediante una pipeta que contiene el colorante 8-Rodamina6G-AMPC. Para obtener el sello es necesario realizar la configuración de *cell-attached* donde se pone en contacto la pipeta con la membrana celular y se realiza una succión suave de tal forma que se obtendrá un gigasello. Una vez obtenido el sello, la configuración de *whole-cell* se consigue rompiendo el parche de membrana en la punta de la pipeta mediante la aplicación de una succión de mayor intensidad. La ruptura del parche crea un continuo entre la solución intracelular y la solución de la pipeta. (Modificado de Kusch *et al.*, 2010).

El protocolo de obtención de imágenes de *whole cell fluorometry* es el siguiente: Al momento de obtener el gigasello en la configuración *cell-attached*, se tomó una imagen de la célula en campo claro, fluorescencia, rendija y espectral utilizando  $\lambda_{\text{Ex}}$  405 nm, posteriormente se realizó la modalidad *whole-cell* para permitir el flujo de la solución de la pipeta a la célula. Una vez que se obtuvo dicha modalidad, de manera inmediata se tomó una imagen espectral cada 2 minutos hasta los 12 minutos si el sello se mantenía, posterior a los 12 minutos se tomó otra imagen en fluorescencia utilizando nuevamente una  $\lambda_{\text{Ex}}$  405 nm y  $\lambda_{\text{Ex}}$  514 nm. De manera similar se adquirieron las imágenes para la corrección del fotoblanqueo utilizando únicamente una  $\lambda_{\text{Ex}}$  405 y sin realizar el *whole-cell*.

Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia invertido con un objetivo de inmersión en aceite Nikon 60x, con una apertura numérica de 1.4 y un *binning* de 1. El microscopio está acoplado a dos láseres. El primer láser es Ar-Ion (Spectra Physics), el cual tiene tres líneas (458/488/514 nm). Se utilizó línea de 514nm para el registro de fluorescencia de 8-Rodamina6G-AMPC y 8-[Dy-547]-AMPC (aceptores). El segundo láser es de estado sólido con emisión de 390 a 410 nm (Compas 405-50 CW-COHERENT), el cual se

utilizó para la excitación de mAmetrine1.2 (donador). El tiempo de exposición del láser fue de 300 ms controlado por dos obturadores, Uniblitz VMM-D1 (Vincent Associates) para el láser verde y SHB1 (THORLABS) para el láser morado, estos se encuentran colocados a la salida de los láseres respectivamente y controlados por el *software* Micromanager (versión 1.4). Ambos láseres están acoplados al puerto de iluminación del microscopio mediante un riel de componentes ópticos, diseñados y fabricados en el laboratorio del Dr. León Islas Suárez (Facultad de Medicina, UNAM). Los componentes son: lente acrópico de 25 mm, lente colimador de 175 mm de distancia focal, lente de 300 mm que enfoca el haz del láser al objetivo. Dentro del microscopio se tienen acoplados en cubos preensamblados los filtros de excitación, espejos dicróicos y filtros de emisión específicos para cada uno de los fluoróforos a utilizar (Tabla 3).

**Tabla 3. Arreglos de los filtros y del espejo dicróico en el microscopio usados para el registro de fluorescencia**

<b>Par FRET</b>	<b>Filtro de excitación</b>	<b>Espejo dicróico</b>	<b>Filtro de emisión</b>
Donador	405/20x	z405rdc	ET 425 lp
Aceptores	514/10x	Z514rdc	HQ 530 lp

La salida del microscopio está acoplada a un espectrógrafo de gradilla Spectra Pro 2150i (Acton Instruments) que se controló a través de su propio *software*. La luz fue captada mediante una cámara EMCCD Andor Ixon Ultra (Oxford Instruments) controlada por Micromanager. Los protocolos de adquisición de datos se manejaron desde el *software* PULSE a través del uso de un arduino UNO (Arduino) que acoplaba y convertía la señal analógica proveniente del amplificador para que Micromanager activara la cámara y el disparador.

Las imágenes de fluorescencia obtenidas mediante *patch clamp fluorometry* se analizaron con los *software* ImageJ, Igor Pro (Wavemetrics) y R. Para cuantificar la disminución de fluorescencia de la membrana celular, se seleccionó una región de la membrana mediante una ROI (región de interés, por sus siglas en inglés) por cada imagen (del momento previo al sello a los 12 min) en el *software* ImageJ, una vez obtenidos los datos de fluorescencia se les restó la señal basal del campo óptico (fondo) en el *software* de Igor Pro para obtener la fluorescencia absoluta de la membrana a lo largo del tiempo, posteriormente se realizó un código en el lenguaje de programación R para la visualización de la forma de los espectros de la intensidad de fluorescencia así como de los espectros normalizados mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta F = \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F_{min})} \quad (8)$$

## VII. RESULTADOS

### Ensayo de FRET *in vitro* entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC

#### Preparación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2

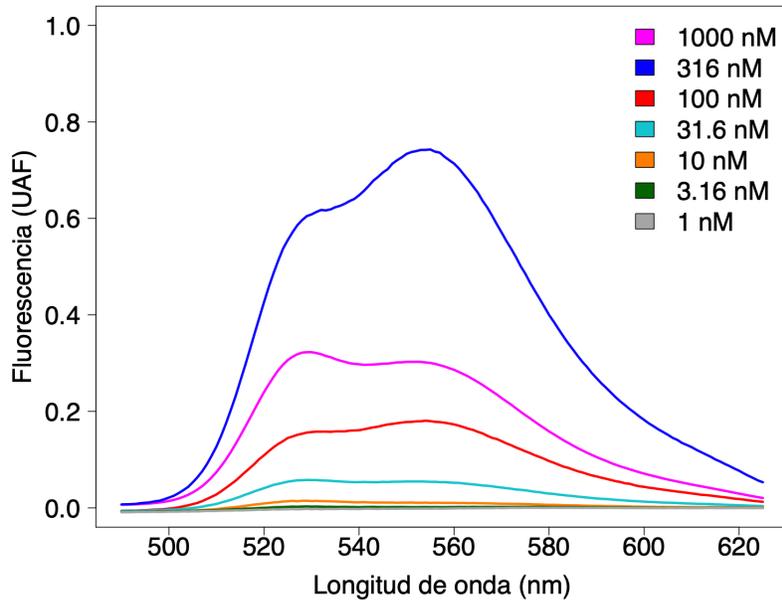
Para realizar el ensayo de unión *in vitro*, purifiqué la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 siguiendo el protocolo descrito en la sección de métodos (pág. 21). Mediante la fórmula (6), calculé la concentración de la proteína purificada. Obtuve aproximadamente un volumen de 500  $\mu$ L con una concentración de 100  $\mu$ M de la a partir de 250 mL del cultivo de *E. coli* BL21(DE3).

#### Espectros obtenidos del ensayo FRET *in vitro*

Una vez realizada la purificación de la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, se llevó a cabo el ensayo de FRET *in vitro* entre el donador EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y el aceptor 8-Rodamina6G-AMPC con una estequiometría de 1:2 respectivamente a partir de diluciones secuenciales como se describe en la sección de métodos (pág. 22); posteriormente se determinaron los espectros de fluorescencia excitando a 408 nm con el fin de observar los cambios de la intensidad de fluorescencia del ensayo de FRET *in vitro* por concentración.

En las gráficas se presentan los picos de emisión del par FRET (Fig. 14), el primer pico corresponde al donador (EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2) y el segundo al aceptor (8-Rodamina6G-AMPC). Conforme aumentan las concentraciones de la relación donador:aceptor, incrementa la intensidad de la fluorescencia, disminuye el pico del donador (primer pico) y a su vez aumenta el pico del aceptor (segundo pico), a excepción de la concentración más alta (1,000 nM, trazo magenta) donde disminuye drásticamente la intensidad de fluorescencia y además aumenta el pico del donador.

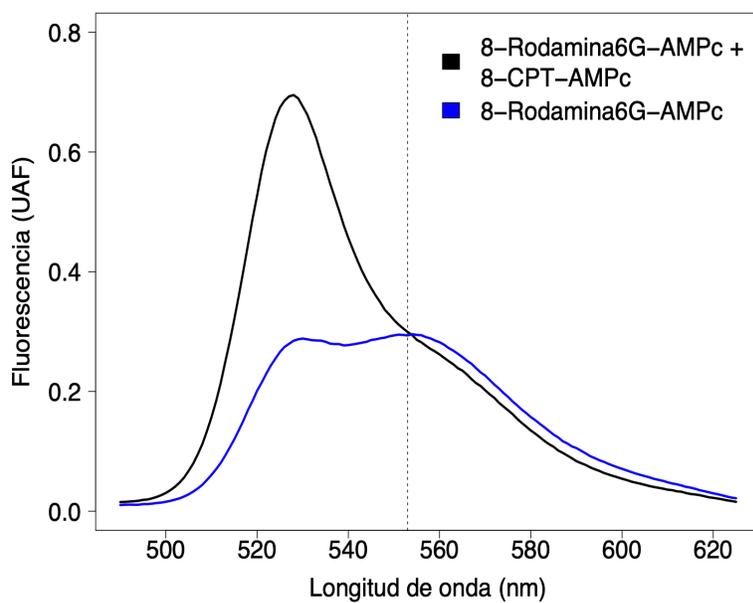
Las intensidades de fluorescencia fueron diferentes dependiendo de la concentración de las muestras, por lo tanto, se modificó el voltaje para evitar la saturación con el fin de no dañar el fotomultiplicador.



**Figura 14. Espectros de fluorescencia representativos de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (donador) y 8-Rodamina6G-AMPC (aceptor) obtenidos del ensayo de FRET *in vitro*.** El panel muestra los espectros a partir de las diluciones con relaciones molares fijas (1:2) pero diferentes concentraciones en entre el donador y acepto. Las concentraciones se determinaron con un factor de dilución 3.16 ( $\sqrt{10}$ ): 1,000 nM, 316 nM, 100 nM, 31.6 nM, 10 nM, 3.16 nM y 1 nM.

#### Ensayo de competencia entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC

Se realizó un ensayo de competencia con 100 nM de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (donador) y 200 nM de 8-Rodamina6G-AMPC (aceptor) (estequiometría 1:2) en presencia y ausencia de 200  $\mu$ M del análogo de AMPc no fluorescente, llamado 8-CPT-AMPC. Se determinaron los espectros de fluorescencia excitando a 408 nm en ambas condiciones (Fig. 15).



**Figura 15. Espectros de fluorescencia del ensayo de competencia.** A partir de 100 nM de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 200 nM de 8-Rodamina6G-cAMP en ausencia (trazo azul) y presencia (trazo negro) de competidor (200  $\mu$ M de 8-CPT-AMPC). La línea punteada indica el punto isobéptico de esta condición experimental.

Como se observa claramente, la intensidad de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (primer pico) es menor en ausencia del competidor que con competidor, indicando que el mayor nivel de FRET ocurre entre el donador y aceptor en ausencia del competidor. En el espectro obtenido en presencia del competidor incrementa el pico del donador al no al no presentar transferencia de energía por tener mayor afinidad al competidor, debido a su concentración excesiva. Los resultados indican que la unión entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC es específica.

El punto máximo de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 se determinó a 528 nm. Las diferencias de las intensidades de fluorescencia de cada condición en el pico del donador (528nm), indica un alto nivel de FRET (más del 50%) entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC en ausencia del competidor 8-CPT-AMPC.

Dicho ensayo permitió determinar el valor del punto isobéptico, el cuál es necesario para la determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ), mostrado en el siguiente experimento. El punto isobéptico consta del punto de intersección (línea punteada) entre el espectro obtenido por el ensayo de unión entre el donador y el aceptor sin competidor (trazo azul) y con competidor (trazo negro). Se determinó a una longitud de 555 nm.

Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC

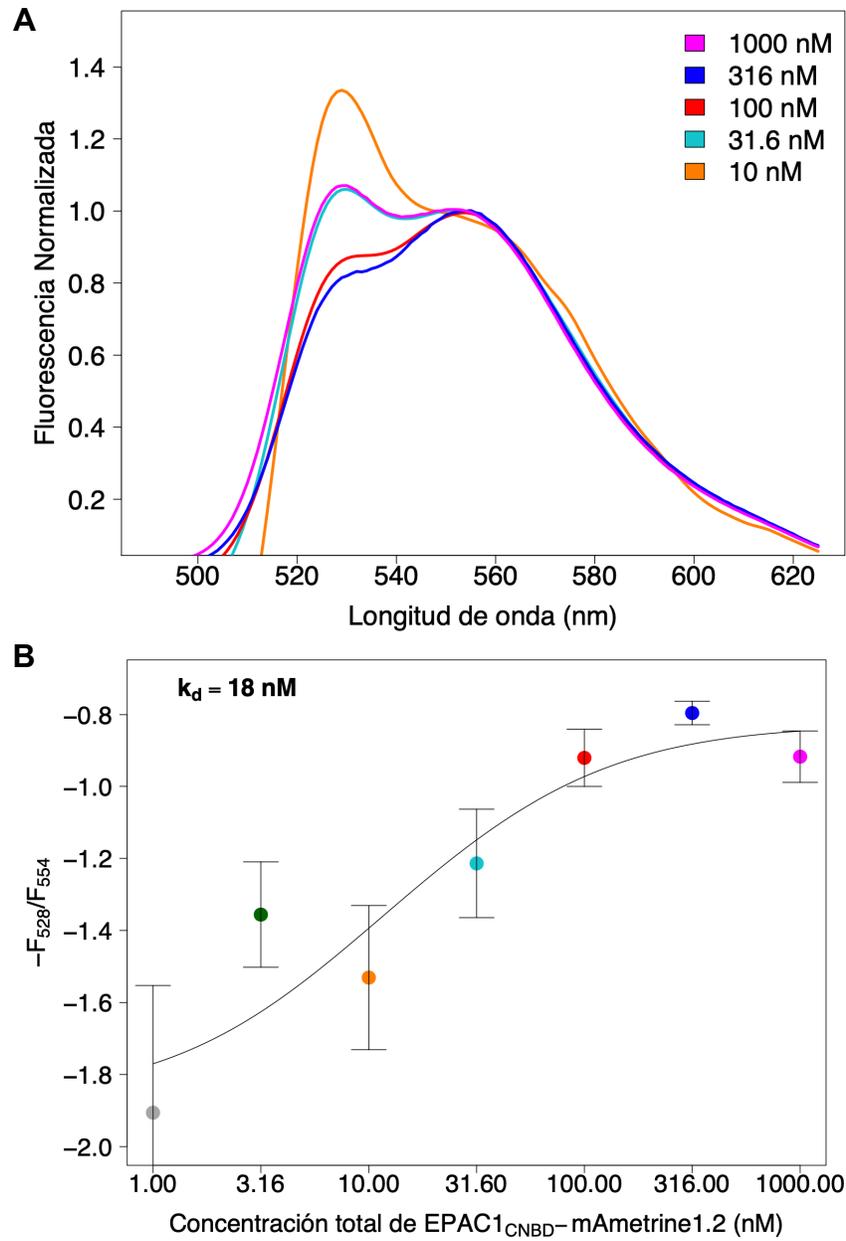
El valor de la  $K_d$  determina la concentración del ligando libre que permite un 50% de ocupación del receptor.

Para determinar la  $K_d$  entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rhodamina6G-AMPC se normalizaron los datos crudos con el punto isobéptico (554 nm). Los espectros de los datos normalizados (Fig. 16A) muestran los cambios de las formas espectrales que indican directamente los cambios de la intensidad de FRET, conservando la relación de los datos crudos (Fig. 14), donde baja la intensidad de FRET en la concentración más alta (1,000 nM).

Posteriormente, se calculó el cociente entre el pico de la intensidad de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (546 nm) y el punto isobéptico (546 nm), en cada concentración. De esta forma determinamos el nivel de FRET a diferentes concentraciones dadas por las diluciones seriales manteniendo la estequiometría (1:2), como se ha reportado anteriormente (Romero *et al.*, 2017).

La figura 16B presenta la eficiencia de FRET entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC representada en función de la concentración total (no libre) de ligando.

Se determinó un valor de  $K_d$  entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rhodamina6G-AMPC de ~18 nM. El valor de la  $K_d$  de cada experimento fue determinado por el mejor ajuste en R usando la fórmula (5).



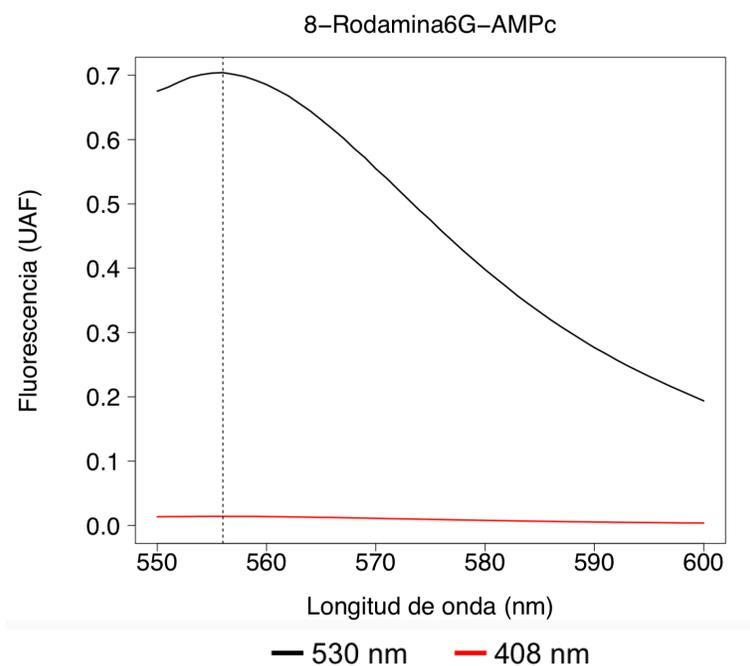
**Figura 16. Determinación de la  $K_d$  entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC.** **A.** Espectros obtenidos del ensayo de FRET *in vitro* con los datos normalizados a partir de la intensidad de fluorescencia del punto isosbético (554 nm). **B.** La gráfica representa la eficiencia relativa de la transferencia de energía ( $-F_{528}/F_{554}$ ) en función de la concentración total de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. La longitud de excitación que se usó en este experimento fue de 408 nm. Las concentraciones fueron las siguientes: 1,000 nM (magenta), 316 nM (negro), 100 nM (rojo), 31.6 nM (verde), 10 nM (azul). Las barras de cada punto representan el error estándar.

## Espectro de emisión de 8-Rodamina6G-AMPc

En la gráfica de fluorescencia del fluoróforo 8-Rodamina6G-AMPc (Fig. 17) se muestra el espectro de emisión luego de usar su respectiva longitud de excitación a 530 nm (línea negra) y la longitud de onda de excitación del donador mAmetrine1.2 (405 nm) (línea roja) (Fig. S2). Esto se realizó con el fin de observar el porcentaje de excitación cruzada.

El porcentaje de excitación cruzada está definido como el cociente del valor máximo de la intensidad de fluorescencia del espectro de emisión a la longitud de excitación del donador ( $Fl_{408}$ ) entre el valor máximo de la intensidad de fluorescencia a su longitud de excitación ( $Fl_{max}$ ) (Santana-Calvo *et al.*, 2018).

El valor máximo de fluorescencia del espectro de emisión corresponde a 556 nm. Se determinó un valor de 2.0% de excitación cruzada.



**Figura 17. Espectro de emisión del aceptor 8-Rodamina6G-AMPc.** El trazo negro corresponde al espectro de emisión obtenido de su respectiva longitud de excitación (530 nm), el trazo rojo corresponde al espectro de emisión excitado a longitud de excitación del donador mAmetrine1.2 (408 nm). La línea punteada marca la longitud de onda donde se encuentra el punto máximo (556 nm).

Ensayo de FRET *in vivo* entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC con microscopía confocal.

Construcción de los plásmidos pcDNAPro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y pcDNAPro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2

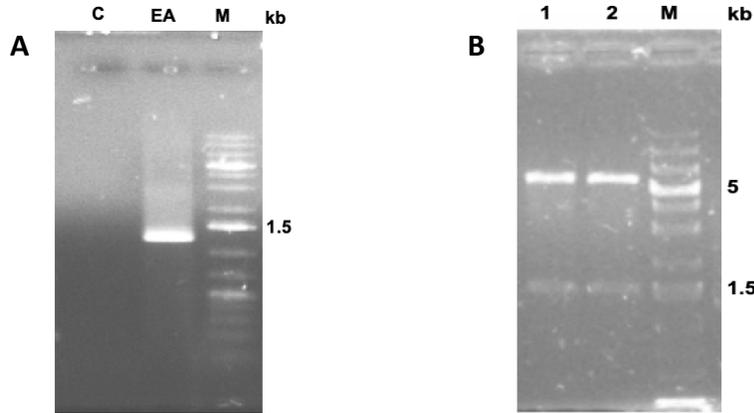
Nuestro grupo previamente preparó un plásmido llamado pcDNA3.1(-)Pro, modificado de pcDNA3.1(-), el cual se expresa únicamente en células eucariotas. Al vector pcDNA3.1(-)Pro se le adicionó un sitio de unión a ribosoma (RBS) de procarionta, por lo tanto, este plásmido nos permite expresar una proteína recombinante tanto en células eucariotas como en procariontas. Además, cuenta con una etiqueta de polihistidinas que permitió la purificación de la proteína fluorescente.

Usando pcDNA3.1(-)Pro-mCherry como el templado (Apéndice 1), preparamos pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 usando los sitios de clonación *NheI* y *HindIII* como se describe en métodos.

Se realizó la amplificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y, como muestra la electroforesis en gel de agarosa (Fig. 18A), se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (1230 pb).

Una vez purificado el plásmido pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 se analizó mediante una restricción. Como muestra la electroforesis en gel de agarosa (Fig. 18B), el patrón de digestión obtenido corresponde con los tamaños esperados de  $\sim 5,170$  y  $\sim 1,460$  pb.

Finalmente se confirmó por secuenciación.



**Figura 18. Gel de agarosa de la amplificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y patrón de digestión de pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2.** A. Se observan la banda respectivas a la amplificación del inserto. El primer carril corresponde al control con agua (C), el segundo carril al inserto EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (EA) que corresponde al tamaño esperado ( ~1,230 pb), el ultimo carril corresponde al marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (M). B. Patrón de digestión de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. El primer y segundo carril corresponden a las bandas de la digestión por las enzimas *Bgl*III y *Bam*HI, las cuales corresponden al tamaño esperado ( ~5,170 y ~1,460 pb), el último carril corresponde al marcador (M).

Por otro lado, la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, fue producto de un PCR a partir de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 mediante la técnica de mutagénesis de sitio dirigido por Quick Change (descrita en Métodos), dando como resultado una mutación puntual que consiste en un cambio de un aminoácido, de una arginina (R) por un ácido glutámico (E) en la posición 279 en la secuencia de la proteína EPAC1 completa. Dicha mutación impide la unión del fosfato del ácido nucleico (AMPc) al PBC del CNBD, por lo tanto, se utilizó posteriormente como control negativo.

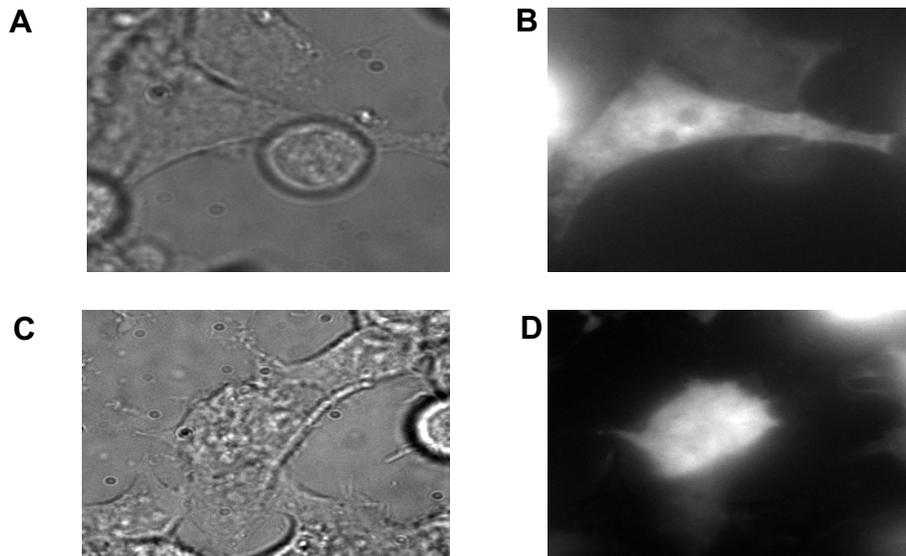
Una vez que se obtuvo el plásmido, se purificó y se mandó a secuenciar, para comprobar la mutación de cambio de base (Fig. 19).



**Figura 19. Alineamiento de secuencias.** En el recuadro se indica la mutación del codón que codifica para arginina (CGG) a ácido glutámico (GAA)

## Confirmación de la expresión de la proteína EPAC1 silvestre y mutante en células eucariotas HEK293

Después de la clonación, se procedió a transfectar las construcciones en células HEK293, para comprobar la expresión de la proteína en células eucariotas. Se logró observar la expresión tanto de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT), como de EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante) en el citoplasma, utilizando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 405 nm (Fig. 20).



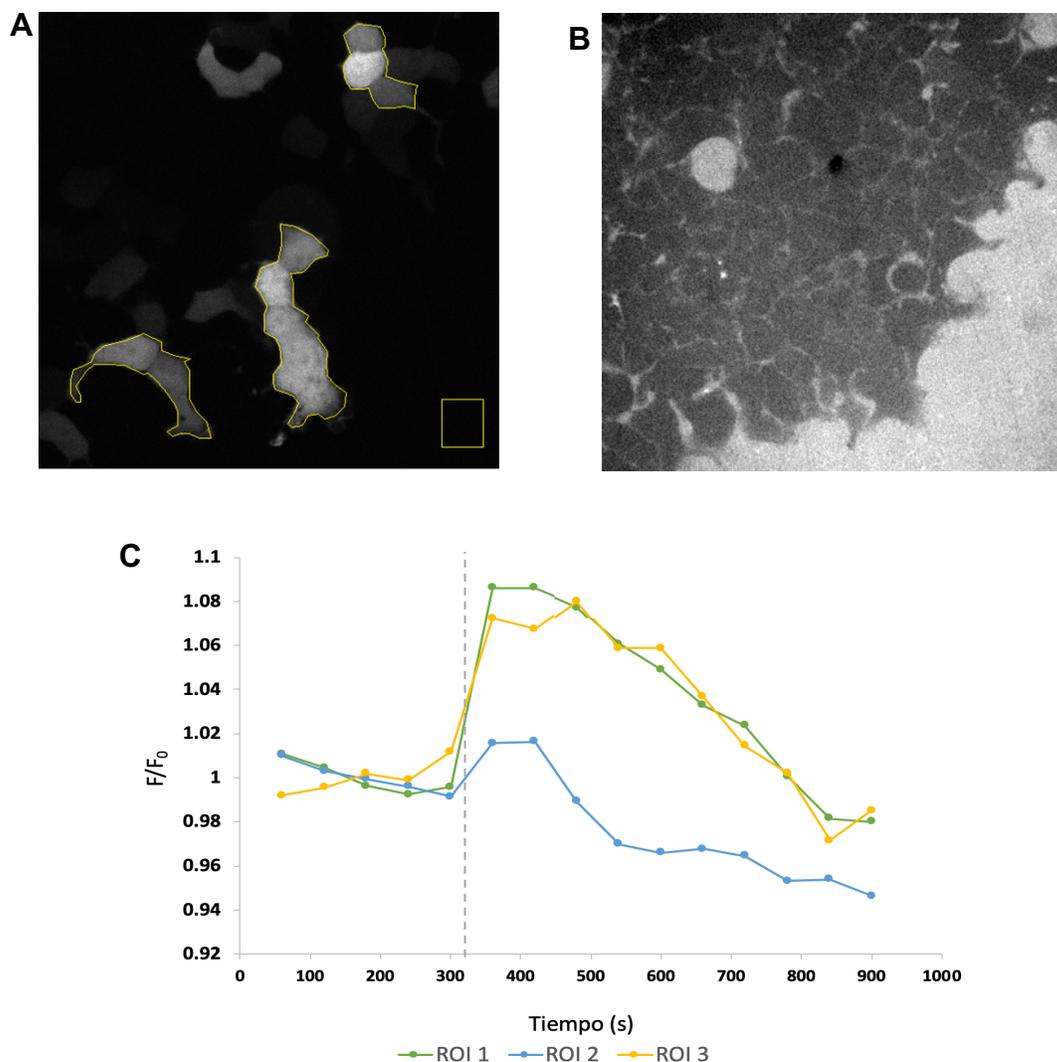
**Figura 20. Expresión de la proteína en células eucariotas HEK293.** Las imágenes corresponden a células que expresan la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en campo claro (**A**) y en fluorescencia (**B**). Las células que expresan la construcción mutante pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en campo claro (**C**) y fluorescencia (**D**). Se utilizó un láser  $\lambda_{exc}$  365 nm. Las células se evaluaron 24 hrs después de la transfección con PolyFect.

## Prueba de ensayo de FRET *in vivo* mediante microscopía confocal

Una vez que confirmamos la expresión de la proteína, se procedió a realizar un ensayo de FRET *in vivo*, mediante microscopía confocal, observando los cambios de fluorescencia en dos canales (descrito en métodos) para el registro de mAmetrine1.2 y 8-Rhodamina6G-AMPC.

En células que expresaban EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 se realizó un análisis preliminar para determinar la disminución de la intensidad de fluorescencia debido a la adición del aceptor 8-Rodamina6G-AMPC (Fig. 21A). Al cuantificar y normalizar los datos (Fig. 21C), contrario a

lo que esperábamos, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia posterior a la adición del aceptor 8-Rodamina6G-AMPC, lo cual fue a los 300 segundos. Sin embargo, en los tiempos posteriores se presentó una disminución de la fluorescencia continua, por lo que se tenía claro el tiempo adecuado para el registro en el ensayo. Además, en el canal para el registro de 8-Rodamina6G-AMPC (Fig. 21B), se observó que el colorante se encontraba fuera de las células, por lo tanto, se procedió a realizar pruebas de permeabilidad.



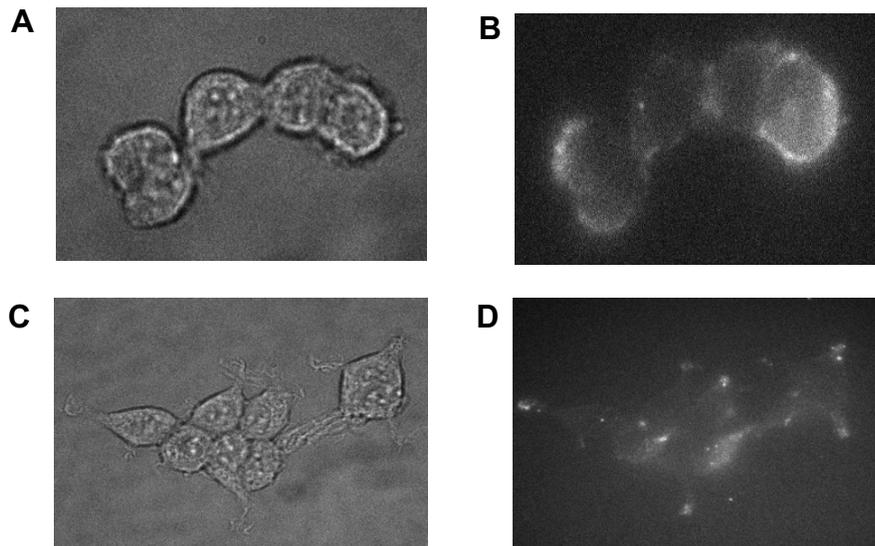
**Figura 21. Registro de fluorescencia de EPAC1<sup>CNBD</sup>-mAmetrine1.2.** **A** En la gráfica se observan los grupos de células seleccionadas (trazos en amarillo) para medir la intensidad máxima de fluorescencia a lo largo del tiempo en el canal de registro de mAmetrine1.2, el cuadro amarillo en la parte inferior derecha muestra la región que se utilizó para restar la señal de fondo. En el panel **B** se muestra el canal para el registro de fluorescencia de 8-Rodamina6G-AMPC. Se observan las células HEK293 (región gris oscuro) posterior a la adición del colorante (gris claro) que se encuentra fuera de las células. **C** Gráfica de los cambios de la

intensidad de fluorescencia de los grupos de células seleccionadas a lo largo del tiempo. El tiempo de adición (300 s) del registro total está señalado por la línea discontinua.

#### Pruebas de permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC

Se realizaron pruebas de permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC para cuantificar el tiempo de permeación del colorante a la membrana celular con el fin de determinar el tiempo de registro del ensayo de FRET *in vivo*.

Se observó que a los 30 minutos de incubación se presenta una ligera señal, principalmente en la membrana (Fig. 22 A). En cambio, a 1 hora de incubación se presenta muy baja intensidad de fluorescencia (Fig. 22 B)., por lo tanto, la permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC no es suficiente para realizar un ensayo de FRET *in vivo*.



**Figura 22. Incubación de 8-Rhodamina6G-AMPC en células eucariotas HEK293.** En las imágenes se observan las células HEK293 cargadas con 8-Rodamina6G-AMPC durante 30 minutos en campo claro (A) y fluorescencia (B). Las imágenes de las células HEK293 cargadas con el colorante durante 1 hora en campo claro (C) y fluorescencia (D). Se utilizó un laser  $\lambda_{exc}$  491 nm.

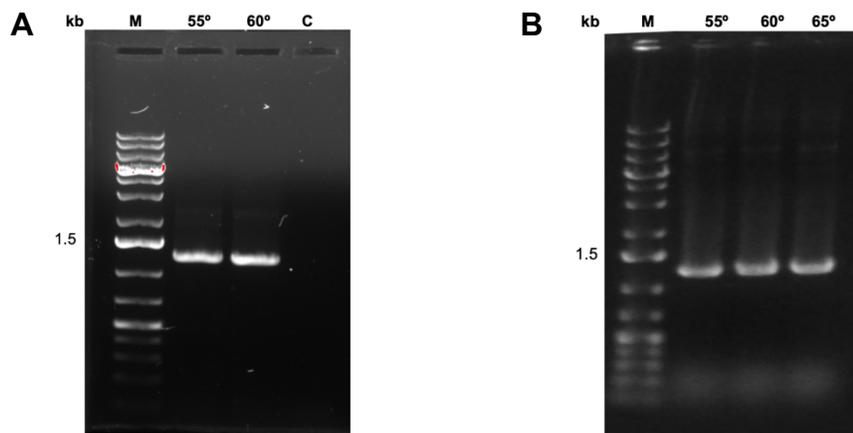
#### Ensayo de FRET *in vivo* mediante sistema de fluorimetría con *patch clamp*

Al comprobar la poca permeabilidad de 8-Rodamina6G-AMPC, se decidió cambiar la estrategia experimental y utilizar la técnica de *patch clamp* para introducir el colorante a la célula por medio de la pipeta. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Mtro. Esteban Suárez Delgado en laboratorio del Dr. León Islas, Facultad de Medicina, UNAM.

Clonación de las construcciones pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub> y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2

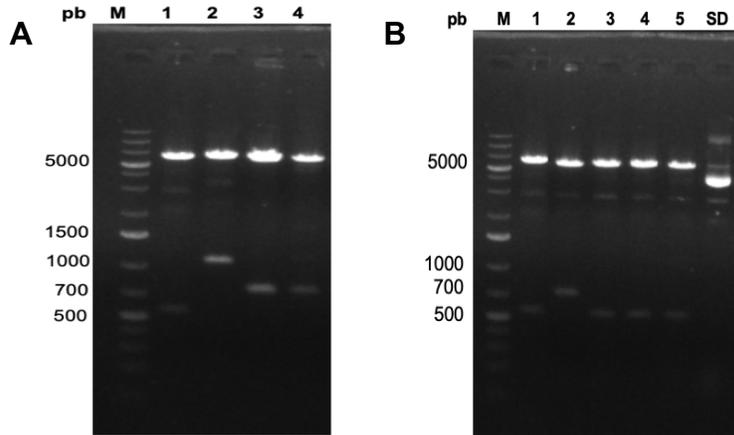
Para realizar los experimentos con la técnica de *patch clamp* fue necesario realizar construcciones que permitieran la expresión de la proteína en la membrana plasmática, por lo que se usaron vectores que inducen las señales postraduccionales: palmitoilación y miristoilación. Estas señales les confieren a las proteínas una fuerte unión a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas con la capa lipídica.

Se realizó la amplificación de EPAC1<sub>CNBD</sub>/EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y mediante una electroforesis en gel de agarosa se comprobó que ambos amplicones tienen el tamaño esperado de 1230 pb (Fig. 23).



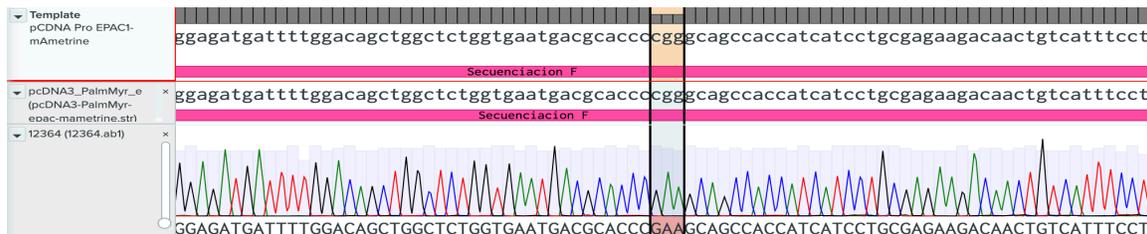
**Figura 23. Gel de agarosa de la amplificación de los insertos.** El gel **A** corresponde al inserto EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, el gel **B** corresponde al inserto EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. El primer carril corresponde al marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (M), los carriles consecuentes corresponden al inserto EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 respectivamente del tamaño esperado (~1,230 pb), con las temperaturas de alineación señaladas, el último carril corresponde al control con agua (C).

Una vez obtenidas las construcciones, se analizó el patrón de digestión obtenido con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III mediante electroforesis en gel (Fig. 24). Las digestiones se obtuvieron con los fragmentos del tamaño esperado, en el caso la construcción pCDNA3.1-PalMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 se obtuvo solo una digestión con bandas de tamaños diferentes a los esperados (Fig. 24B, carril (2)), por lo tanto, se descartó.



**Figura 24. Patrones de digestión de la construcciones.** El gel **A** corresponde al patrón de digestión para la confirmación de la construcción pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, donde el primer carril corresponde al marcador (M), el carril marcado como (1) corresponde a la digestión de pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 con bandas del tamaño esperado (~6,050 y ~530), el carril (2) corresponde a la digestión de pcDNA-PalMyr-EYFP-EPAC2B-ECFP (~6,250 y ~1,050), el carril (3) corresponde a la digestión de pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (~5,900 y ~720), el carril (4) corresponde a la digestión de pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (~5,900 y ~720). El gel **B** corresponde al patrón de digestión de la construcción pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, donde el primer carril corresponde al marcador (M), en los carriles marcados del (1) al (5) corresponde a pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 digerido donde en el carril (2) se observan tamaños de bandas diferentes al esperado, del carril (3) al (5) se obtuvieron los tamaños esperados, el carril (SD) corresponde a la construcción sin digerir.

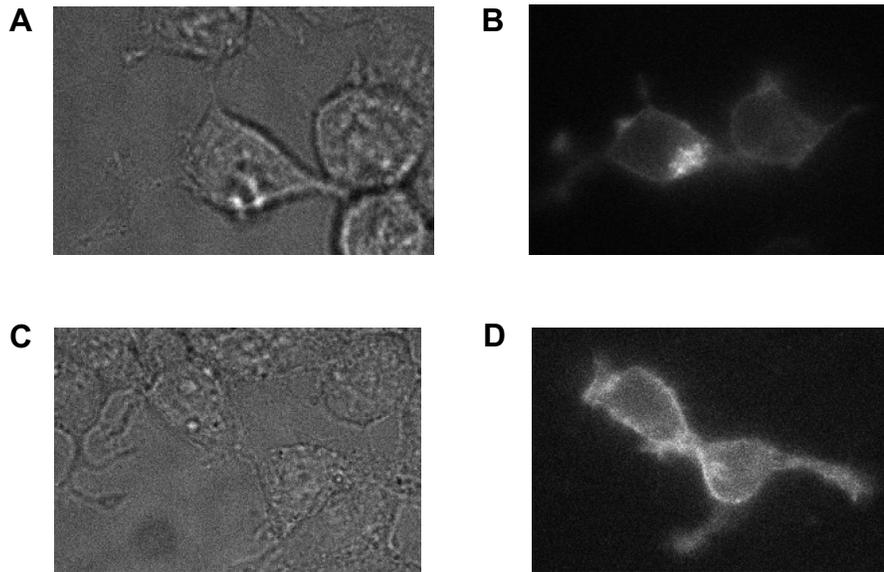
Finalmente se secuenciaron las construcciones pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y pcDNA3.1-PalMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (positivas). En el caso de la mutante, se verificó la mutación puntual (Fig. 25).



**Figura 25. Alineamiento de secuencias.** En el recuadro se indica la mutación del codón que codifica para la arginina (CGG) a ácido glutámico (GAA).

## Confirmación de la expresión de los plásmidos en células eucariotas HEK293

Después de la clonación, se procedió a transfectar las construcciones pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (Fig. 26A) y pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (Fig. 26B) en células HEK293 para comprobar la expresión de la proteína en la membrana plasmática debido a la señal de palmitoilación y miristoilación que induce el vector. Se logró observar la señal de fluorescencia en la membrana de la célula utilizando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 405 nm.

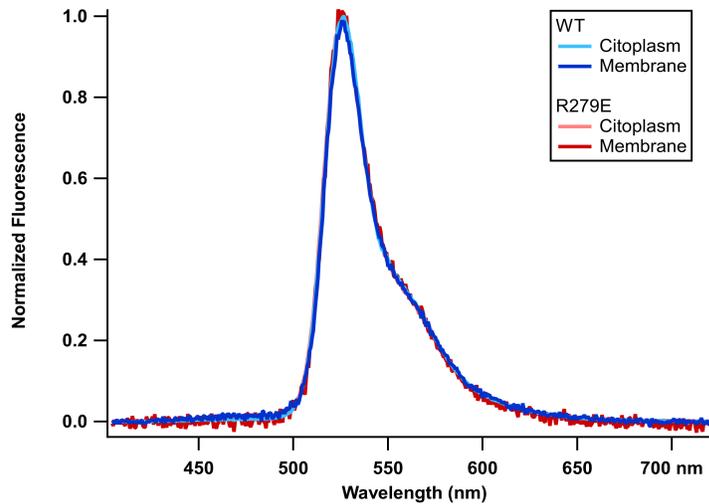


**Figura 26. Expresión de plásmidos en células eucariotas HEK293.** **A** Imágenes de las células transfectadas con la construcción pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>. **B** Imágenes de las células transfectadas con la construcción que contiene la variante mutada EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2. Ambos paneles se muestran en campo claro y fluorescencia observadas con  $\lambda_{exc}$  405 nm. Las fotos fueron tomadas 48 hrs después de la transfección con PolyFect.

Espectros de emisión obtenidos de las proteínas EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 expresadas en células HEK293

Para verificar que la proteína EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 tenían las mismas características espectrales en todas las construcciones realizadas, se tomó el espectro de excitación en células transfectadas con pCDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) y pCDNA3.1-Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante), que se expresan en el citoplasma, así como pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) y pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante), que se expresan en la -

membrana. Todas presentaron el mismo espectro de emisión (Fig. 27) al usar una longitud de excitación de 405 nm.

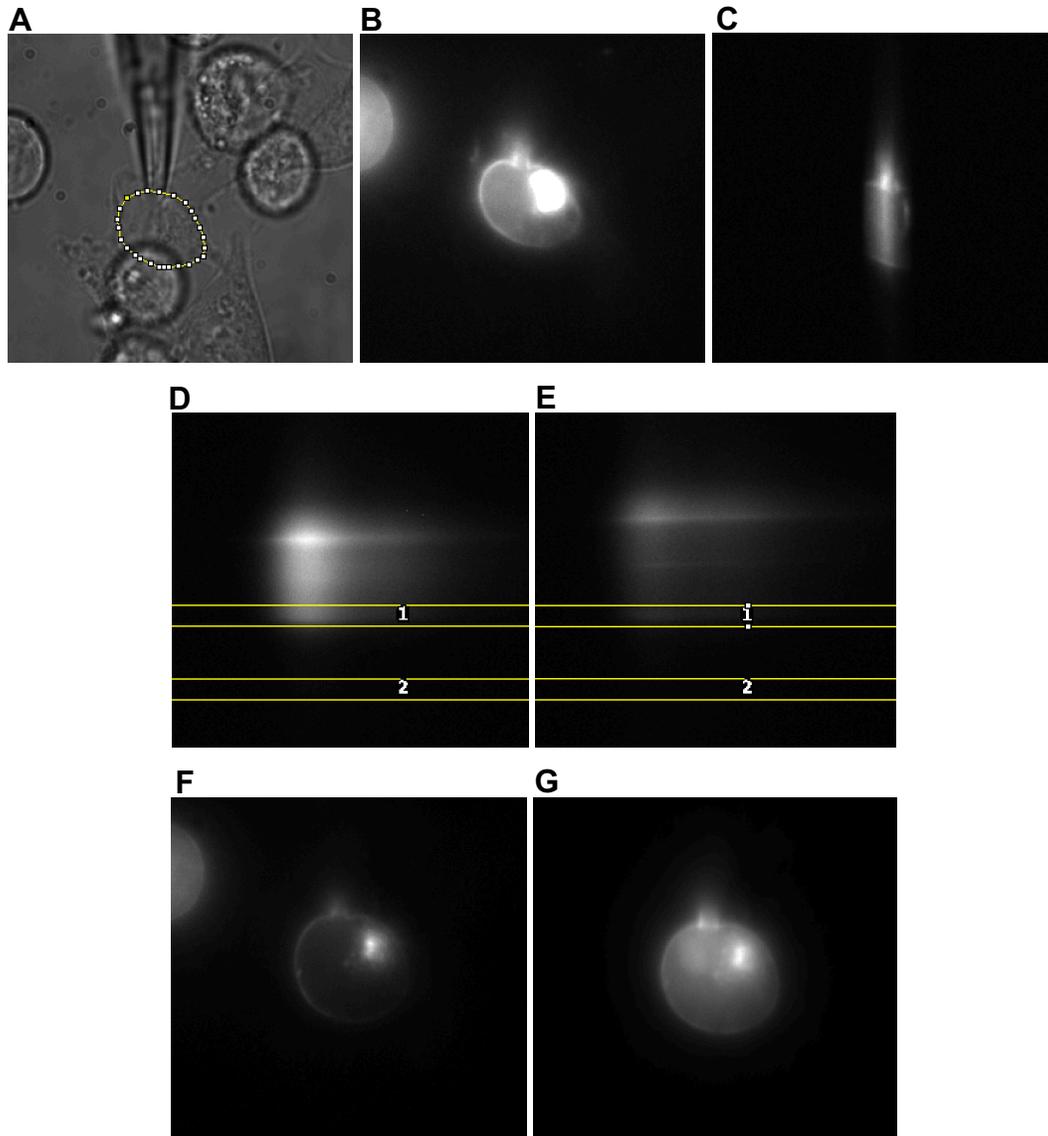


**Figura 27. Espectros de emisión de las proteínas WT y mutantes en células HEK293.** Todos los espectros se tomaron a partir de las construcciones expresadas en células HEK293. El espectro de la construcción pCDNA3.1-Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) corresponde al trazo azul claro, el espectro de pCDNA3.1-Pro-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante) corresponde al trazo rojo claro, ambas se expresan en el citoplasma. El espectro obtenido de pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) corresponde al trazo azul oscuro, pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante) está indicado de color rojo oscuro, ambas se expresan en la membrana de la célula.

Espectros de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y aceptores obtenidos mediante *patch-clamp fluorometry*

Aprovechando la técnica de *patch clamp* como herramienta de permeabilidad decidimos probar con los dos aceptores ya conocidos para mAmetrine1.2, 8-[Dy-547]-AMPc y 8-Rodamina6G-AMPc. A partir de células que expresaban pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub> (WT) y pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1R279E<sub>CNBD</sub> (mutante).

Para verificar que el sello se mantuvo a lo largo del registro, se tomó una imagen de fluorescencia posterior a los 12 minutos del sello donde es evidente que se presentó una disminución de la intensidad de fluorescencia de mAmetrine1.2 del minuto previo al sello (Fig. 28B) a los 12 minutos posterior al sello (Fig. 28F) debido a la transferencia de energía (FRET). Además, se adquirió una imagen utilizando  $\lambda_{\text{Ex}}$  514 nm para observar la emisión de 8-[Dy-547]-AMPc o de 8-Rodamina6G-AMPc.

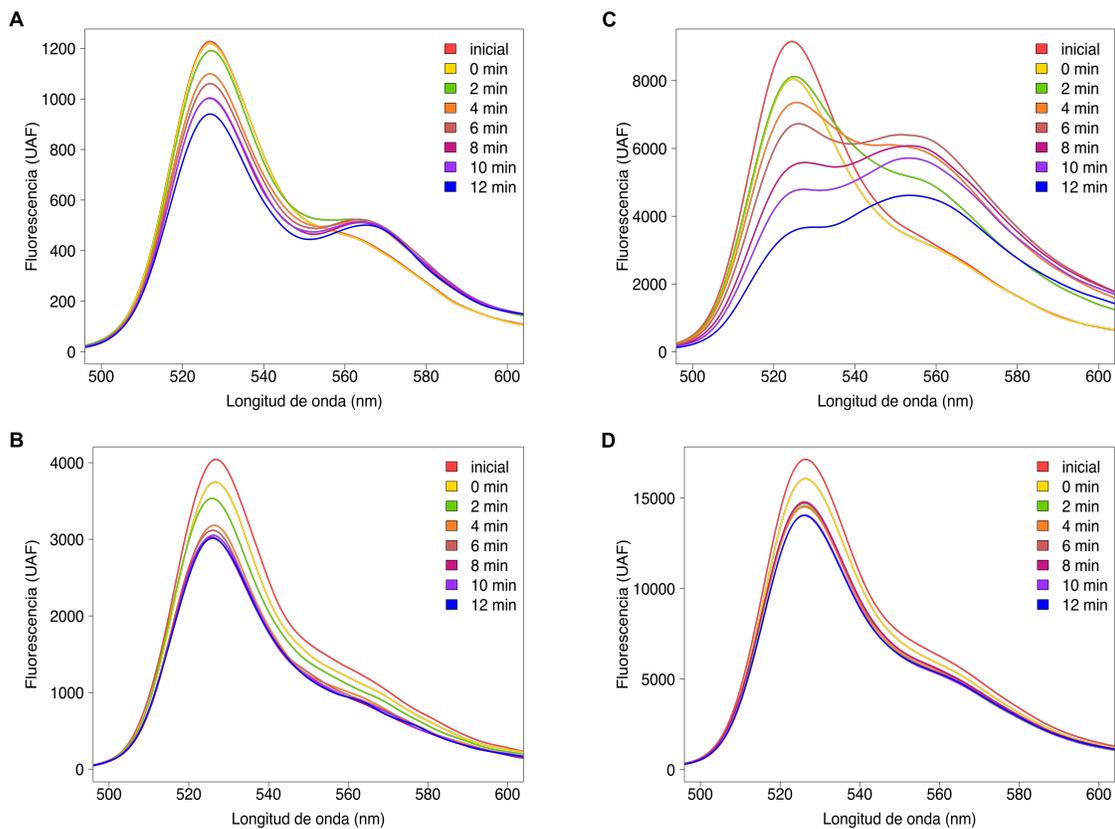


**Figura 28. Set de imágenes obtenidas por *patch clamp fluorometry*.** Adquisición de imágenes de las células por condición (WT, DY) con 8-[Dy-547]-AMPc u 8-Rodamina6G-AMPc. **A** Imagen en campo claro de una célula que expresa mAmetrine1.2 en la membrana de la célula (pCDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>mAmetrine1.2). **B** Imagen en fluorescencia previo al sello utilizando una  $\lambda_{\text{Ex}}$  405 nm **C** Imagen de la célula con la rendija. **D** Imagen espectral previa al sello, la región de interés de la membrana se encuentra delimitada por el recuadro amarillo (1), la región de fondo (2) **E** Imagen espectral a los 12 min posterior al sello, la región de interés de la membrana se encuentra delimitada por el recuadro amarillo (1), la región de fondo (2). **F** Imagen de la célula posterior a los 12 min utilizando  $\lambda_{\text{Ex}}$  405 nm. **G** Imagen de la célula posterior a los 12 min utilizado  $\lambda_{\text{Ex}}$  514 nm.

El seguimiento de la intensidad de fluorescencia se tomó de una región de la membrana de la célula desde el minuto previo a realizar el *patch clamp* al minuto 12 posterior al *patch*

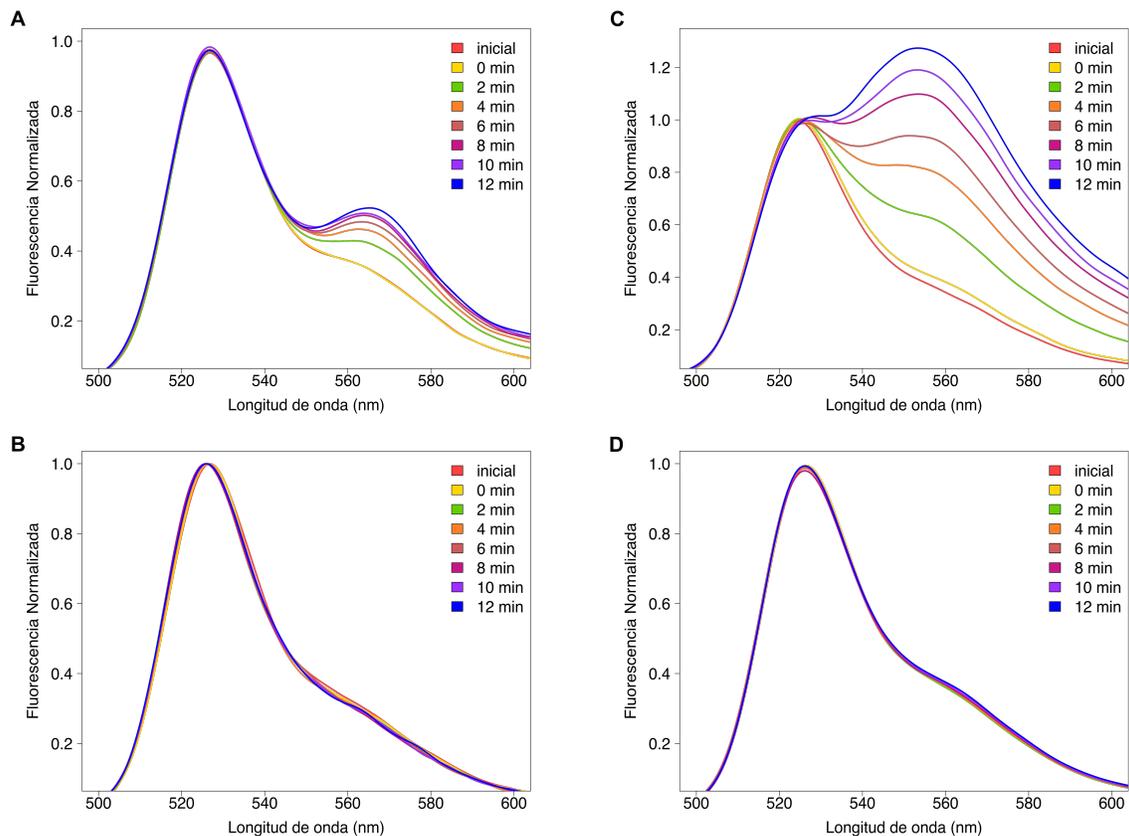
*clamp* (Fig. 28D, E) para obtener los espectros a lo largo del tiempo de difusión del colorante.

En los espectros obtenidos de células que expresaban la construcción WT, se observó que conforme aumentaba el tiempo de diálisis con el aceptor 8-[Dy-547]-AMPc (Fig. 29A, C) u 8-Rodamina6G-AMPc (Fig. 28C, D), incrementó la transferencia de energía (FRET), esto se vio reflejado en un incremento del pico que corresponde al aceptor (segundo pico), con la disminución del pico que corresponde al donador (primer pico) a través del tiempo. En cambio, el espectro obtenido de la membrana de las células que expresaban la mutante (Fig. 29B, D), el pico de fluorescencia del aceptor no aumentó, por lo tanto, no se observó FRET. Debe de considerarse que se presenta una disminución de fluorescencia del donador en todos los ensayos debido al fotoblanqueo de la proteína mAmetrine1.2 a consecuencia de la continua exposición del láser.



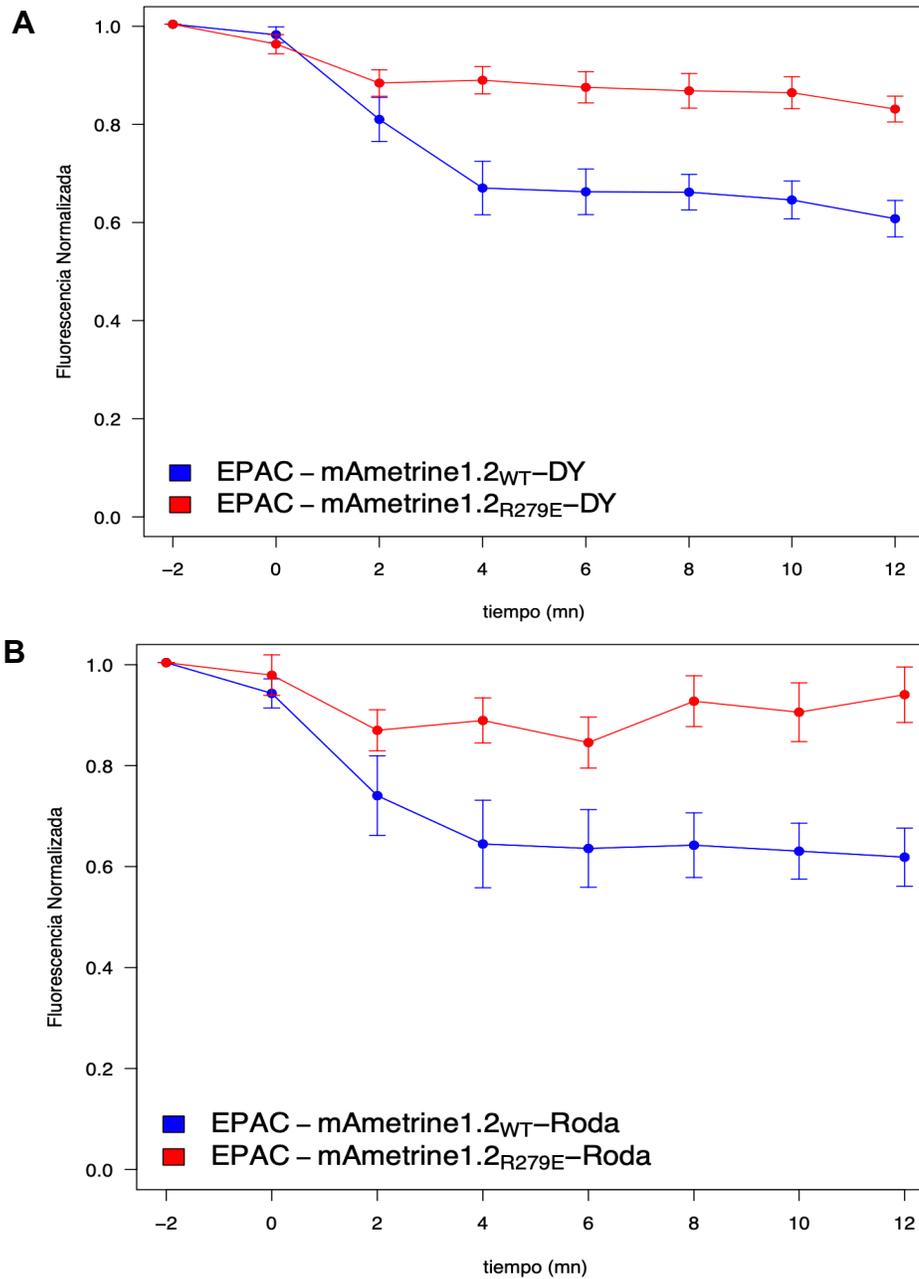
**Figura 29. Espectros de emisión obtenidos del ensayo de FRET *in vivo*.** En los espectros se observa la intensidad de fluorescencia a través del tiempo del momento previo a *whole cell* (tiempo inicial) a los 12 minutos posterior al *whole cell* de células que expresan la construcción WT (A,C) y la mutante (B,D), con el aceptor 8-[Dy-547]-AMPc (A,B) y 8-Rodamina6G-AMPc (C,D).

La normalización de los espectros a partir del pico máximo del donador permite comparar la forma de los espectros a través del tiempo, por lo que de manera evidente se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia del pico del aceptor proporcional al tiempo de difusión de 8-Rodamina6G-AMPC. En el caso del par EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPC se observó mayor transferencia de energía en las células que expresaban la construcción WT, esto se ve reflejado en la forma del espectro en donde el segundo pico aumenta con un mayor rango a través del tiempo. En el caso de las células que expresaban EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 la forma del espectro no cambió independiente al tiempo de difusión (Fig. 30).



**Figura 30. Espectros de emisión normalizados obtenidos del ensayo de FRET *in vivo*.** En los espectros se observa la intensidad de fluorescencia a través del tiempo del momento previo a *whole cell* (tiempo inicial) a los 12 minutos posterior al *whole cell* de células que expresan la construcción WT (A,C) y la mutante (B,D), con el aceptor 8-[Dy-547]-AMPC (A,B) y 8-Rodamina6G-AMPC (C,D).

Una vez que observamos que se presentó FRET, se cuantificó la disminución de la fluorescencia del donador a través del tiempo. El momento previo al *whole cell* se registró como minuto -2, en cuanto se realizó el parche se registró como minuto 0 hasta los 12 minutos (Fig.31)



**Figura 31. Disminución de la fluorescencia de las proteínas.** En las gráficas se observa la tendencia de la disminución de la fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) y EPAC1<sub>R279E</sub><sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante) a través del tiempo por FRET *in vivo*. La gráfica **A** se obtuvo utilizando el donador 8-[Dy-5467]-AMPC (WT, n=6), (R279E, n=8) la gráfica **B** se obtuvo utilizando el donador 8-Rodamina6G-AMPC (WT, n=6), (R279E, n=5). Las barras de cada punto representan el error estándar.

El primer punto, corresponde al momento previo al *whole cell* (-2), por lo tanto, presentó la intensidad máxima de fluorescencia, la transferencia de energía se reflejó en la disminución de fluorescencia una vez que se realizó el sello (tiempo 0), por lo tanto, los puntos consecuentes muestran la fluorescencia remanente entre cada intervalo de tiempo. En cada trazo se corrigió la disminución de la intensidad de fluorescencia por fotoblanqueo.

## VIII. DISCUSIÓN

### Ensayo de FRET *in vitro*

El objetivo principal de este proyecto fue desarrollar un ensayo de FRET *in vivo* entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC con el fin de evaluar diversas proteínas que tienen CNBD como posibles blancos para nucleótidos cíclicos prescindiendo de la necesidad de realizar el proceso de purificación. En ocasiones, lograr la purificación de ciertas proteínas sin perder su actividad bioquímica es un proceso complicado, costoso e incluso no factible debido a la necesidad de mantenerse en el medio citoplasmático para su estabilidad y conformación adecuada. Un ejemplo es el CNBD del sNHE de ratón, a pesar de ser de gran interés para el campo de la biología de la reproducción, actualmente no se ha podido confirmar la interacción de su CNBD con nucleótidos cíclicos debido a las complicaciones para lograr su purificación.

Para lograr dicho objetivo se decidió probar nuestro ensayo tipo FRET *in vivo* con el CNBD de EPAC1, debido a que ya se conoce su interacción con AMPc. Además, nuestro laboratorio ha propuesto diversos pares FRET a partir del CNBD de dicha proteína como EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP/8-Fluo-AMPc y EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-[Dy-547]-AMPc.

El objetivo inicial era realizar un ensayo de unión *in vivo* aprovechando la permeabilidad del colorante, por esta razón no se utilizó el aceptor 8-[Dy-547]-AMPc ya que presenta muy baja permeabilidad debido a dos grupos sulfato en su estructura química, por lo tanto nuestro grupo previamente preparó un nuevo análogo fluorescente de AMPc, llamado 8-Rodamina6G-AMPc, esperando a que funcionara como sustituto del aceptor 8-[Dy-547]-AMPc debido a la similitud de los espectros de absorción de ambos colorantes y que además fuera permeable, puesto que Rhodamina6G tiene una alta permeabilidad a la membrana plasmática.

Inicialmente se probó el par en un ensayo de FRET *in vitro*. Como primer punto se determinó que EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPc presentan unión específica. La

interacción entre dichas moléculas se comprobó mediante la transferencia de energía por medio del ensayo, donde a medida que aumentó la concentración del donador y aceptor (estequiometría 1:2), la intensidad de fluorescencia incrementó. Esto presentó una correlación con la disminución del espectro de emisión del donador (primer pico) y el aumento del espectro de emisión del aceptor (segundo pico). Curiosamente, en la concentración más alta del donador (1  $\mu$ M), la intensidad de fluorescencia disminuyó y se registró por debajo de la intensidad dada por la concentración de 316 nM del donador (Fig. 14) a diferencia de como lo han reportado con pares FRET anteriores (Romero *et al.*, 2017; Santana-Calvo *et al.*, 2018). Este fenómeno posiblemente está relacionado a los cambios en la forma del espectro de excitación que presenta 8-Rodamina6G-AMPC en altas concentraciones (Ghomashchi *et al.*, 1991; Tajalli *et al.*, 2009).

Debido a este fenómeno, es complicado calcular la eficiencia de FRET (mediante la fórmula (3)) de manera muy precisa, ya que se necesita realizar un ensayo donde se presente 100% de unión entre ligando y receptor. Dicha unión se asegura con altas concentraciones de ligando y receptor, que es donde nuestro par presentó inconvenientes. Sin embargo, en el ensayo de competencia a pesar de que se realizó con una concentración de 100 nM (no muy alta) se presentó un incremento del 50% del pico del donador en presencia del competidor (Fig. 15), por lo tanto, la eficiencia de FRET entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC, podría ser de mayor del 50%.

Por otra parte, mediante el ensayo de competencia también se comprobó la unión específica entre las moléculas. Al agregar el competidor a una concentración excesiva (1,000 veces más) en comparación con la del aceptor, la intensidad de fluorescencia del donador incrementó (Fig. 15).

La unión específica entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPC era un resultado esperado, debido a la similitud de los espectros con pares ya comprobados (Ai, *et al.*, 2008; Santana-Calvo *et al.*, 2018), no obstante, se determinaron parámetros de 8-Rodamina6G-AMPC que demuestran ventajas para utilizarlo como aceptor.

Una de ellas es que 8-Rodamina6G-AMPC cuenta con mayor eficiencia cuántica que el aceptor 8-[Dy-547]-AMPC (Tabla. 2), por lo tanto, nuestro aceptor se caracteriza por presentar una alta emisión y gran intensidad de brillo.

Otra ventaja del par que se utilizó es que presenta mayor afinidad. Esta afinidad está reflejada en el valor de la  $K_d$  obtenida (18 nM), en comparación a la  $K_d$  entre EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-[Dy-547]-AMPC (713 nM) (Santana-Calvo *et al.*, 2018) y a la afinidad entre

el CNBD y el AMPc intacto (4  $\mu$ M) (De Rooij *et al.* 2000). Sin embargo, esto no quiere decir que 8-Rodamina6G-AMPc presente la misma afinidad con otros CNBDs.

Además, el par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPc muestra menor nivel de excitación cruzada que EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP/8-Fluo-AMPc, aunque mayor nivel comparado con EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-[Dy-547]-AMPc (Tabla 4).

**Tabla 4. Porcentajes de excitación cruzada de diferentes pares FRET**

<b>Pares FRET</b>	<b>(<math>Fl_{\lambda_{lex}}/Fl_{max}</math>)</b>	<b>Excitación cruzada (%)</b>
CFP-8-Fluo-AMPc	$Fl_{434}/Fl_{494}$	6.6
mAmetrine1.2-8-[Dy-547]-AMPc	$Fl_{408}/Fl_{559}$	0.1
mAmetrine-8-Rodamina6G-AMPc	$Fl_{408}/Fl_{530}$	2.0

#### Ensayo de FRET *in vivo*

Una vez que se determinó a 8-Rodamina6G-AMPc como un buen aceptor, se decidió utilizar EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPc para realizar el ensayo de FRET *in vivo*.

Inicialmente, la metodología consistió en adicionar el aceptor 8-Rodamina6G-AMPc a células que expresaran el donador EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en el citoplasma, observando la intensidad de fluorescencia mediante microscopía confocal. Se evaluaron los cambios de fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (donador) posterior a la adición de 8-Rodamina6G-AMPc (aceptor). El resultado esperado era obtener una disminución de la fluorescencia posterior a la adición del aceptor debido a la transferencia de energía por FRET, contrario a lo que esperábamos, al momento de la adición se registró un aumento de la intensidad de fluorescencia, a los 7 minutos de registro la fluorescencia fue disminuyendo de manera paulatina hasta el término del registro (15 minutos). Sin embargo, cuando se observaron las células en el canal de 8-Rodamina6G-AMPc, se percibió que el colorante se encontraba en el medio externo de las células (Fig. 21B). Por tal motivo, se pensó que el tiempo de registro no fue suficiente para que el colorante pasara la membrana celular y procedimos a realizar pruebas de permeabilidad para determinar el tiempo de registro de nuestro ensayo de FRET *in vivo*.

Cuando se realizaron las pruebas de permeabilidad, cargando el colorante en células sin transfección, se concluyó que 8-Rodamina6G-AMPc no era lo suficientemente permeable a la membrana (Fig. 22). Se observaron pequeños compartimentos fluorescentes tras las 2

horas de incubación, las cuales podrían ser vesículas de degradación (Fig. S3). Revisando la literatura, se identificó que el principal problema de la poca permeabilidad de los análogos del AMPc es el fosfato con carga negativa (Schultz *et al.*, 1994). Para obtener un análogo de alta permeabilidad a la membrana plasmática se necesita modificar el fosfato del AMPc con la sustitución de un oxígeno por azufre o la agregación del grupo acetoximetil éster (Schultz *et al.*, 1993). Sin embargo, preparar nuevos análogos de AMPc resulta un proceso complicado y tardado, por lo que se decidió cambiar de estrategia experimental.

Como estrategia alternativa para solucionar el problema, se utilizó la técnica de fluorimetría acoplada a *patch clamp* para lograr introducir el colorante a la célula por medio de la pipeta y prescindir de la permeabilidad del análogo de AMPc. Esta técnica resulta ser innovadora para la realización de un ensayo de FRET *in vivo* debido a que hasta ahora la aplicación exclusiva de dicha técnica es la caracterización biofísica de los canales iónicos.

En un principio se propuso utilizar las construcciones previamente hechas que expresaban EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 en el citoplasma. Sin embargo, se planteó que la diálisis del citoplasma iba a ser más rápida que la interacción proteína-nucleótido, por lo tanto, se decidió expresar la proteína a partir de un vector que le confiere modificaciones postraduccionales como miristoilación y palmitoilación para guiar su localización a la membrana celular. Dichas modificaciones postraduccionales les confieren a las proteínas una fuerte unión a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas con la capa lipídica.

A partir de los espectros obtenidos de los ensayos de FRET *in vivo* con los datos normalizados (Fig. 30A,B), es evidente que con 8-Rodamina6G-AMPc, los picos correspondientes al aceptor (segundo pico), presentaron un mayor rango de aumento en comparación con los espectros obtenidos con el aceptor 8-[Dy-547]-AMPc, esto se debe a la mayor eficiencia cuántica de 8-Rodamina6G-AMPc, por lo que en un ensayo de unión utilizando fluorimetría acoplada a *patch clamp* resulta mejor opción utilizar el par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPc, siempre y cuando no se utilice un CNBD de afinidad baja a AMPc (valor alto de  $K_d$ ) debido a que el par *in vitro* presentó problemas en altas concentraciones, como se mencionó anteriormente. Se propone utilizar el análogo 8-[Dy-547]-AMPc cuando no se necesiten concentraciones muy altas del aceptor para observar la interacción.

En el caso de los espectros obtenidos con las mutantes que no se unen al AMPc (R279E) (Fig. 29C,D), como era de esperarse, en los espectro no se observó el aumento del segundo pico y en los espectros con datos normalizados mantuvieron la misma forma a través del

tiempo de difusión del colorante (Fig. 30C,D) debido a que no se presentó transferencia de energía. A pesar de que el par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rhodamina6G-AMPC en el ensayo de FRET *in vitro* muestra un porcentaje de excitación cruzada, en el caso del ensayo *in vivo* no se presentó dicho fenómeno a la concentración que se realizó el ensayo (1  $\mu$ M), aunque posiblemente a una concentración mucho más alta como 10  $\mu$ M podría presentarse y se vería reflejado en el aumento del segundo pico en el espectro obtenido de la variante con la mutación.

Los resultados de fluorimetría acoplada a *patch clamp* muestran una clara diferencia de los espectros de fluorescencia entre un CNBD funcional y uno no funcional, por lo que este método funciona como un ensayo de unión cualitativo con base en FRET. Sin embargo, para utilizar este método como un ensayo de unión cuantitativo, fue necesario distinguir la disminución de fluorescencia del donador (mAmetrine1.2) por FRET a la disminución dada por el fotoblanqueo.

Para el tiempo de registro se determinaron 12 minutos ya que no se presentaban grandes diferencias en los cambios de la intensidad fluorescencia en tiempos posteriores.

Para cuantificar la disminución de la fluorescencia a través del tiempo dados por la transferencia de energía se cuantificaron los cambios de fluorescencia del donador *pre* y *pos* FRET (hasta 12 minutos) (Fig. S6).

La normalización de los datos se realizó con el pico máximo del donador de cada trazo, de tal forma que fue posible cuantificar la intensidad de fluorescencia remanente a través del tiempo, registrando el tiempo previo al sello como el valor máximo de fluorescencia (1.0).

La disminución de fluorescencia se corrigió tomando en cuenta el fotoblanqueo ) (Fig. 31). Es importante señalar que a pesar de la corrección sigue presentándose en todas las condiciones una disminución de la fluorescencia que no corresponde a la transferencia de energía del minuto previo al minuto 2 (disminución reflejada en la mutante), probablemente está relacionado a algún artefacto debido al sello. La disminución de fluorescencia por fotoblanqueo que se contempo fue a de la continua exposición en células que expresaban EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 sin realizar el sello, por lo que sería más adecuado medir la disminución en células con el sello en donde la pipeta tenga solución sin colorante.

La técnica aquí descrita puede emplearse para evaluar la capacidad de unión de CNBD de otras proteínas con nucleótidos cíclicos en tiempo real y en condiciones fisiológicas.

## IX. CONCLUSIONES

- Se determinó que EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y 8-Rodamina6G-AMPc presentan unión específica. La interacción entre dichas moléculas se comprobó mediante la transferencia de energía por medio de los ensayos de FRET *in vitro*, FRET *in vivo* y ensayo de competencia.
- El par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPc presentó mayor afinidad que el par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-[Dy-547]-AMPc.
- El par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-Rodamina6G-AMPc mostró menor nivel de excitación cruzada que EPAC1<sub>CNBD</sub>-CFP/8-Fluo-AMPc, pero mayor nivel comparado con EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2/8-[Dy-547]-AMPc.
- La disminución de fluorescencia en el ensayo de FRET *in vitro* a 1  $\mu$ M posiblemente esté relacionado al cambio del espectro de 8-Rodamina6G-AMPc debido a su alta concentración.
- El donador 8-Rodamina6G-AMPc no fue lo suficientemente permeable a la membrana para realizar el ensayo de FRET *in vivo*.
- Los espectros obtenidos con 8-Rodamina6G-AMPc en el ensayo de FRET *in vivo* presentaron un mayor cambio de forma en comparación con los espectros usando al aceptor 8-[Dy-547]-AMPc, esto se debe a la mayor eficiencia cuántica de la 8-Rodamina6G-AMPc.
- En el caso de los espectros obtenidos con las mutantes incapaces de unirse al AMPc (R279E), no se presentó transferencia de energía, por lo tanto, no se observaron cambios en la forma de los espectros.
- Con el par EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmatrine1.2/8-Rhodamina6G-AMPc no se presentó el fenómeno de excitación cruzada en el ensayo de FRET *in vivo*. Sin embargo, a concentraciones mucho más altas probablemente podría presentarse.
- Fue posible cuantificar la intensidad de fluorescencia remanente a través del tiempo en el ensayo de FRET *in vivo*.

- La técnica de fluorimetría acoplada a *patch clamp* resultó ser una herramienta innovadora para la determinación de la interacción molecular en tiempo real con potencial para probar diferentes CNBDs y nucleótidos cíclicos.

## X. PERSPECTIVAS

- Determinar la eficiencia de FRET.
- Determinar la corrección del fotoblanqueo a partir de células con el sello y solución de pipeta sin colorante.
- Realizar un ensayo de FRET *in vivo* mediante el sistema de fluorimetría con *patch clamp* entre EPAC1-mAmetrine1.2 expresada en citoplasma y 8-Rodamina-6G-AMPC/8-[Dy-547]-AMPC.
- Probar otros CNBDs de proteínas diferentes (sNHE de ratón) para confirmar que el ensayo *in vivo* es funcional en otras proteínas que probablemente se unen a nucleótidos.
- Mejoramiento del par FRET: Sustituir mAmetrine1.2 por mT-Sapphire (10 veces más resistente sobre fotoblanqueo) con el análogo fluorescente de AMPC ya sintetizado (8-ATTO520-cAMPC).

## XI. REFERENCIAS

Abramowitz, M. and Fester, William-Olympus America, Inc., Two Corporate Center Drive., Melville, New York, 11747.

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., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2016). *Molecular Biology of the Cell* 6th edition (New York: Garland Science). *Annals of Botany*, 91, 401.

Bos, J.L. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 680–6.

Braslavsky, S. E., Fron, E., Rodríguez, H. B., San Román, E., Scholes, G. D., Schweitzer, G., ... & Wirz, J. (2008). Pitfalls and limitations in the practical use of Förster's theory of resonance energy transfer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(12), 1444-1448.

Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., De Gruiter, H. M., ... & Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature methods*, 13(7), 557.

De Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R. H., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20829-20836.

Ding, Y., Ai, H., Hoi, H. & Campbell, R.E. 2011. Förster resonance energy transfer- based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca<sup>2+</sup> dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical Chemistry* 83: 9687–93.

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.

Ghomashchi, E., Ghanadzadeh, A., Mahjani, M. G., Hasanpour, M., & Niavaran, H. Z. (1991). On the aggregative properties of Rhodamine 6G in ethanolic solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 47(2), 211-217.

Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12501-12504.

Jiang, S. Z., Xu, W., Emery, A. C., Gerfen, C. R., Eiden, M. V., & Eiden, L. E. (2017). NCS-Rapgef2, the Protein Product of the Neuronal Rapgef2 Gene, Is a Specific Activator of D1 Dopamine Receptor-Dependent ERK Phosphorylation in Mouse Brain. *eNeuro*, 4(5).

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

Koschinski, A., & Zacco, M. (2015). A novel approach combining real-time imaging and the patch-clamp technique to calibrate FRET-based reporters for cAMP in their cellular microenvironment. In *cAMP Signaling* (pp. 25-40). Humana Press, New York, NY.

Kusch, J., Biskup, C., Thon, S., Schulz, E., Nache, V., Zimmer, T., ... & Benndorf, K. (2010). Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron*, 67(1), 75-85.

Kusch, J. and G. Zifarelli, *Patch-clamp fluorometry: electrophysiology meets fluorescence*. *Biophys J*, 2014. 106(6): p. 1250-7.

Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, NY, USA.

Lezoualc'h, F., Fazal, L., Laudette, M., & Conte, C. (2016). Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease. *Circulation research*, 118(5), 881-897.

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(22), 3385-3393.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Molecular cell biology 4th edition. *National Center for Biotechnology Information, Bookshelf*.

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.

Salceda, E., & Soto, E. (2015). Métodos electrofisiológicos para el estudio de los efectos y mecanismos de acción de toxinas que actúan sobre canales iónicos. *Estrategias y avances en el estudio de toxinas de interés para la biomedicina*, México pp.99-117.

Santana-Calvo, C., Romero, F., López-González, I., & Nishigaki, T. (2018). Robust evaluation of intermolecular FRET using a large Stokes shift fluorophore as a donor. *BioTechniques*, 65(4), 211-218.

Sekar, R. B., & Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology*, 160(5), 629-633.

Steegborn, C. (2014). Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases—similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2535-2547.

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. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26581-26586.

Quill, T. A., Wang, D., & Garbers, D. L. (2006). Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 84-92

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(1), 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.

Romero, F., Santana-Calvo, C., Sánchez-Guevara, Y., & Nishigaki, T. (2017). FRET-based binding assay between a fluorescent cAMP analogue and a cyclic nucleotide-binding domain tagged with a CFP. *FEBS letters*, 591(18), 2869-2878.

Romero, F. (2018). Estudio bioquímico y filogenético del intercambiador Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> específico del espermatozoide, Instituto de Biotecnología, UNAM (tesis grado doctoral en Bioquímicas).

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.

Schultz, C., Vajanaphanich, M., Harootunian, A. T., Sammak, P. J., Barrett, K. E., & Tsien, R. Y. (1993). Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6316-6322.

Schultz, C., Vajanaphanich, M., Genieser, H. G., Jastorff, B., Barrett, K. E., & Tsien, R. Y. (1994). Membrane-permeant derivatives of cyclic AMP optimized for high potency, prolonged activity, or rapid reversibility. *Molecular pharmacology*, 46(4), 702-708.

Tajalli, H., Gilani, A. G., Zakerhamidi, M. S., & Moghadam, M. (2009). Effects of surfactants on the molecular aggregation of rhodamine dyes in aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 72(4), 697-702.

Vallejo, L. F. & Rinas, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* 3, 11 (2004).

Windler, F., Bönigk, W., Körschen, H. G., Grahn, E., Strünker, T., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2018). The solute carrier SLC9C1 is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature communications*, 9(1), 2809.

## XII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1. Protocolo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3:00 min	1
Desnaturalización	95 °C	0:30 seg	30
Alineamiento	55 °C	0:30 seg	
Extensión	72 °C	30 s/Kb (Vent) / 1min/Kb (SuperFi)	
Extensión final	72 °C	5:00 min	1
Mantenimiento	12 °C	∞	1

**Tabla S2. Mezcla de reacción de PCR**

Reactivo	Volumen	Concentración final
Amortiguador ThermoPol (10x)	5 µL	1x
Desoxinucleótidos (dNTPs, 10 mM)	1.5 µL	300 µM
Oligonucleótido 5' (3 µM)	5 µL	0.3 µM
Oligonucleótido 3' (3 µM)	5 µL	0.3 µM
Templado de DNA (50 ng/µL)	1 µL	1 ng/µL
DNA Polimerasa Vent (2 U/µL)	0.5 µL	0.02 U/µL
MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	2.5 µL	5 mM
H <sub>2</sub> O	Aforar a 50 µL	

**Tabla S3. Protocolo para QuikChange (QC)**

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3:00 min	1
Desnaturalización	95 °C	0:30 seg	19
Alineamiento	55 °C	0:30 seg	
Extensión	72 °C	1 min/Kb	

Extensión final	72 °C	10:00 min	1
Mantenimiento	12 °C	∞	1

**Tabla S4. Mezcla de reacción para *QuikChange* (QC)**

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer Phusion High-Fidelity (5x)	10 µL	1x
Desoxinucleótidos (dNTPs, 10 mM)	1.5 µL	300 µM
Oligonucleótido 5' (5 µM)	5 µL	0.5 µM
Oligonucleótido 3' (5 µM)	5 µL	0.5 µM
Templado de DNA (30 ng/µL)	1 µL	0.6 ng/µL
DNA Polimerasa Phusion (2 U/µL)	0.6 µL	0.02 U/µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µL	1 mM
H <sub>2</sub> O	Aforar a 50 µL	

**Tabla S5. Digestión de *QuikChange* (QC)**

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer Fast Digest (10x)	5 µL	1x
Templado de DNA (500-1,000 ng/µL)	x µL	~30 ng/ µL
DpnI (10 U/µL)	1 µL	0.2 U/µL
H <sub>2</sub> O	Aforar a 50 µL	

**Tabla S6. Mezcla de reacción de PCR**

Reactivo	Volumen	Concentración final
SuperFi Buffer (5x)	10 µL	1x
SuperFi Enhancer (5x)	10 µL	1x
Desoxinucleótidos (dNTPs, 10 mM)	1 µL	200 µM

Oligonucleótido 5' (3 μM)	5 μL	0.3 μM
Oligonucleótido 3' (3 μM)	5 μL	0.3 μM
Templado de DNA (50 ng/μL)	2 μL	2 ng/μL
DNA Polimerasa Platinum SuperFi (2 U/μL)	0.5 μL	0.02 U/μL
H <sub>2</sub> O	Aforar a 50 μL	

**Tabla S7. Oligonucleótidos usados**

Oligonucleótidos	Secuencia	Función
Tak 103 F	5'-G <b>GCTAGC</b> GAATTCGAGGAGTTGGCC-3'	Agrega el sitio de restricción <i>NheI</i> al extremo 5' de EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2
Tak 46 R	5' <b>GCAAGCTT</b> TTACTTATACAGCTCGTCC AT GCC-3'	Agrega el sitio de restricción <i>HindIII</i> al extremo 3' de EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2
Tak 225 F	5'-GCA CCC gaa GCA GCC ACC ATC ATC- 3'	Oligonucleótido directo para la mutación de R279E en el PBC del CNBD de EPAC1
Tak 226 R	5'-GGC TGC ttc GGG TGC GTC ATT CA- 3'	Oligonucleótido reverso para la mutación de R279E en el PBC del CNBD de EPAC1
Tak 202 R	5'-CGG <b>AAG CTT</b> CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'	Agrega el sitio de restricción <i>HindIII</i> al extremo 3' de EPAC1 <sub>CNBD</sub> -mAmetrine1.2
Tak 07 F	5'-CACTGCTTACTGGCTTATCG-3'	Oligonucleótido directo complementario al vector pcDNA3.1(-)Pro, se encuentra antes del sitio de clonación múltiple

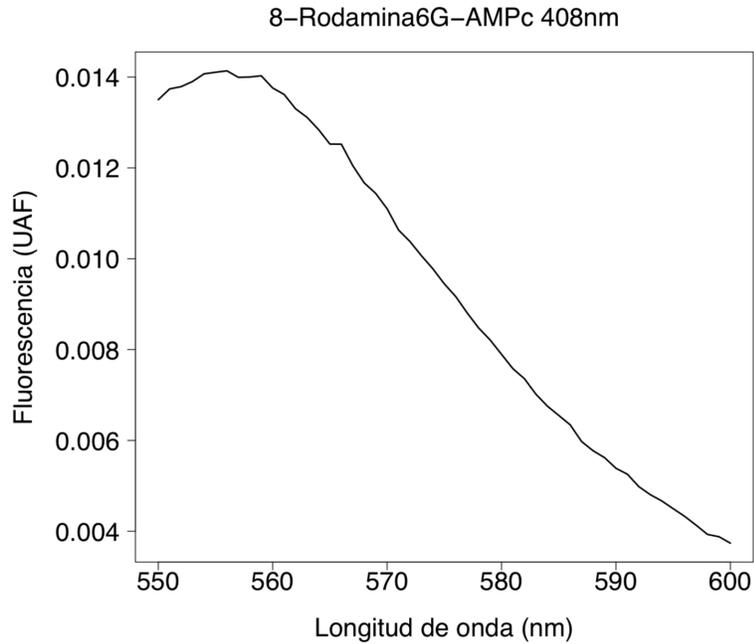
Tak 18	5'-GGAAAGGACAGTGGGAGTGG-3'	Oligonucleótido reverso complementario al vector pcDNA3.1(-)Pro, se encuentra antes del sitio de clonación múltiple
--------	----------------------------	---

**Tabla S8. Soluciones utilizadas en los experimentos de fluorometría acoplada a *patch clamp***

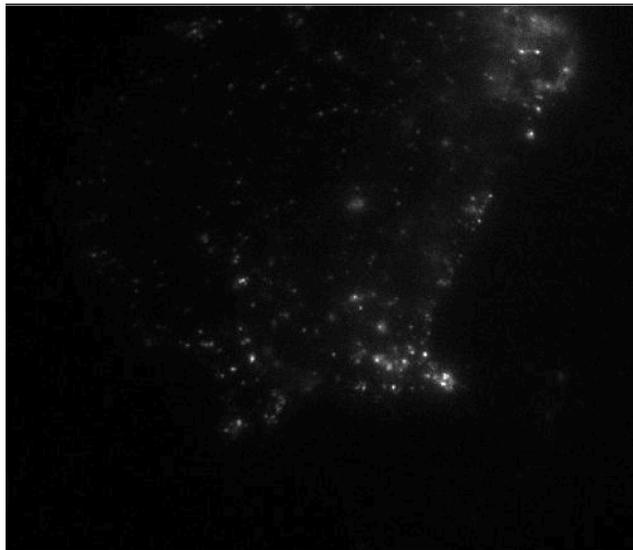
Baño	Pipeta
150 mM NaCl	140 mM KCl
4 mM KCl	4 mM NaCl
2 mM CaCl <sub>2</sub>	2 mM MgCl
1 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM EGTA
5 mM Glucosa	5 mM HEPES
pH 7.4 titulado con NaOH	1 μM 8-Rodamina6G-AMPC/8-[Dy-547]-AMPC



**Figura S1. Gel de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de las proteínas quiméricas, EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 y EPAC<sub>CNBD</sub>-CFP.** El primer carril corresponde al marcador, el carril A1 y A2 corresponde a la proteína EPAC<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2, el carril B1 corresponde a EPAC<sub>CNBD</sub>-CFP que se corrió como control.



**Figura S2. Espectro de emisión del aceptor 8-Rodamina6G-AMPc a una  $\lambda_{exc}$  de 408 nm.** El trazo negro corresponde al espectro de emisión obtenido con la longitud de excitación del donador mAmetrine1.2 (408 nm). Este espectro corresponde al trazo rojo de la Fig. 17.



**Figura S3. Célula cargada con 8-Rodamina6G-AMPc.** Se observan los pequeños compartimentos fluorescentes en el citoplasma de una célula HEK293 cargada durante 2 horas con 8-Rodamina6G-AMPc. Se propone que posiblemente el colorante se va a vesículas. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite con apertura numérica N 60X/1.49.

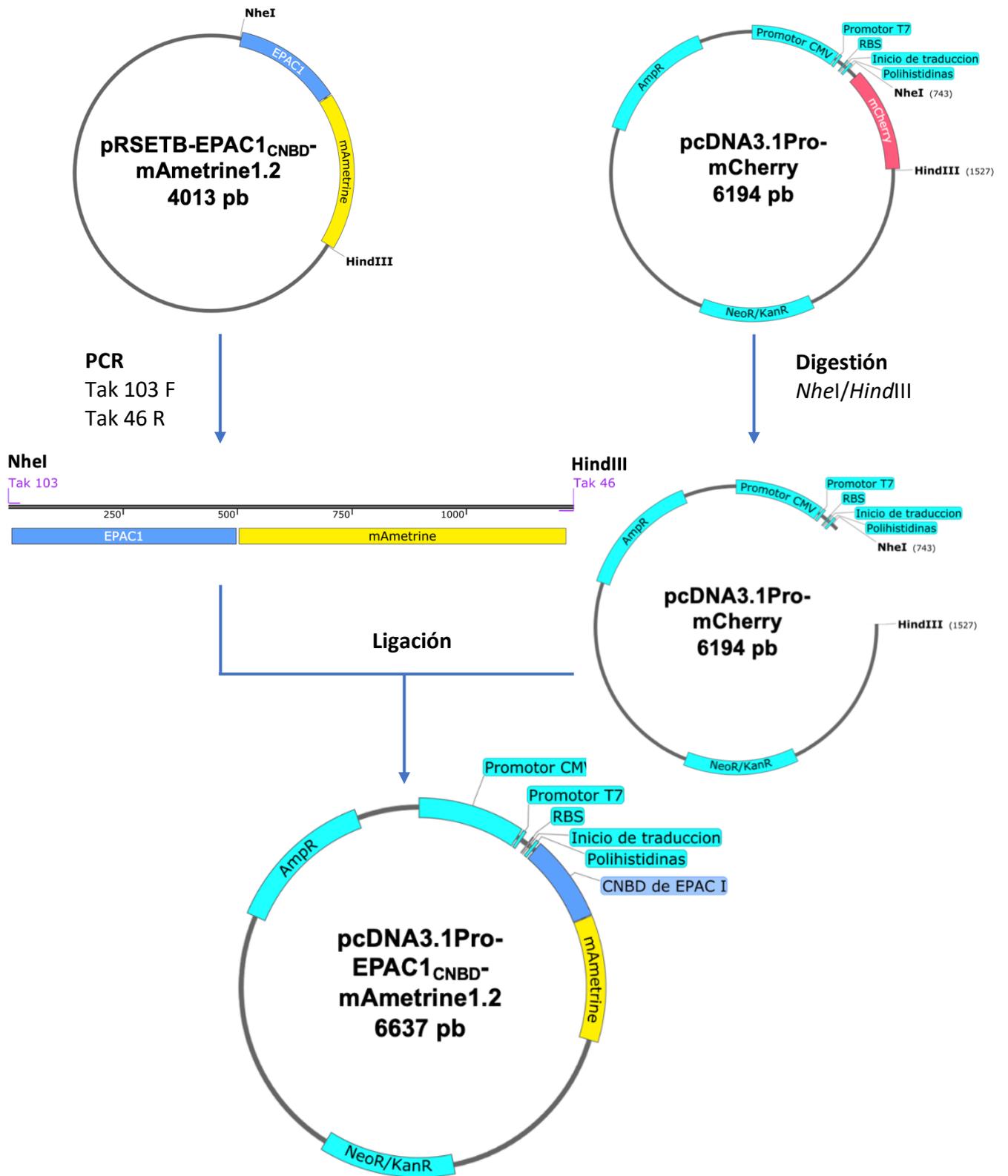


Figura. S4. Diseño de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2.

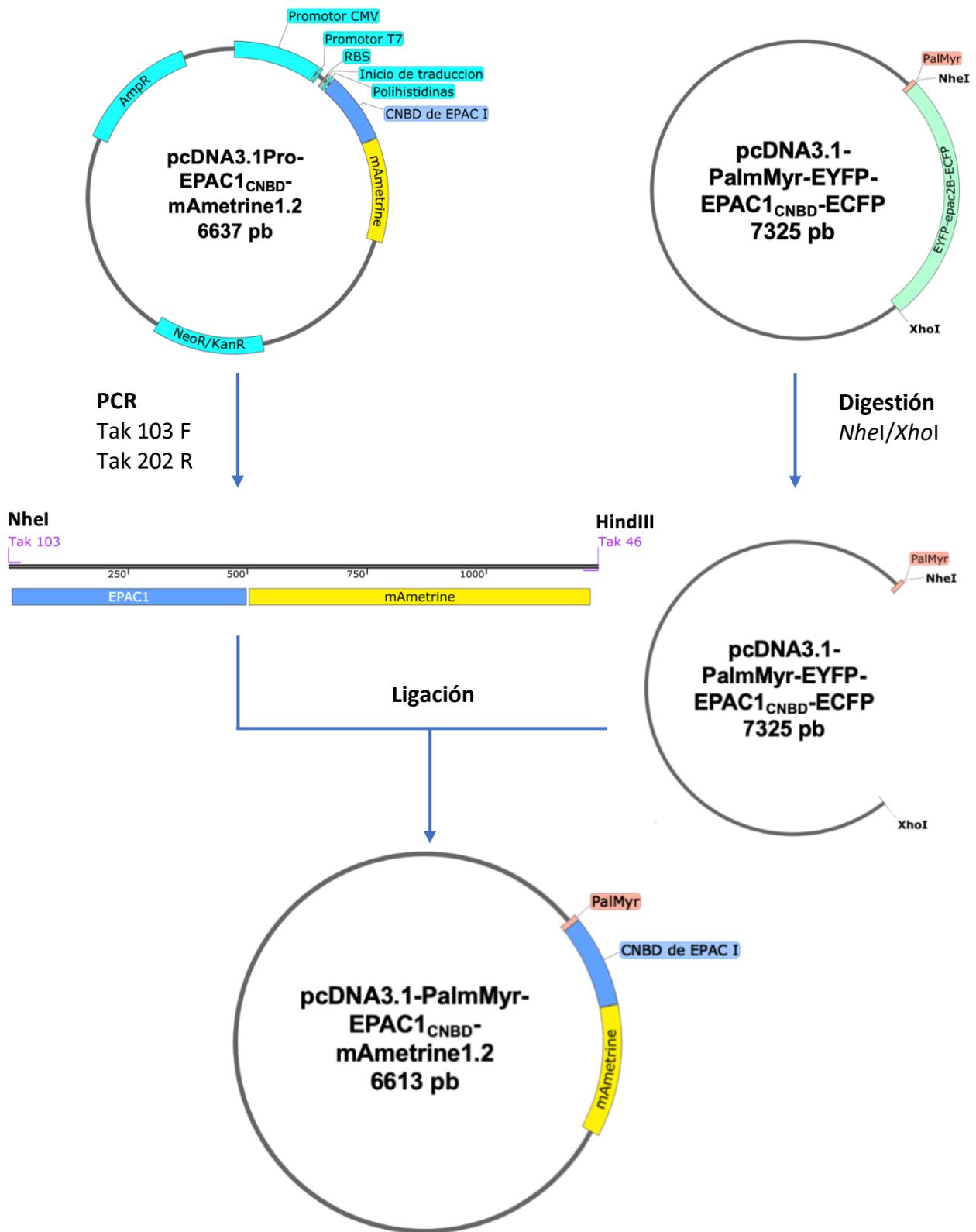
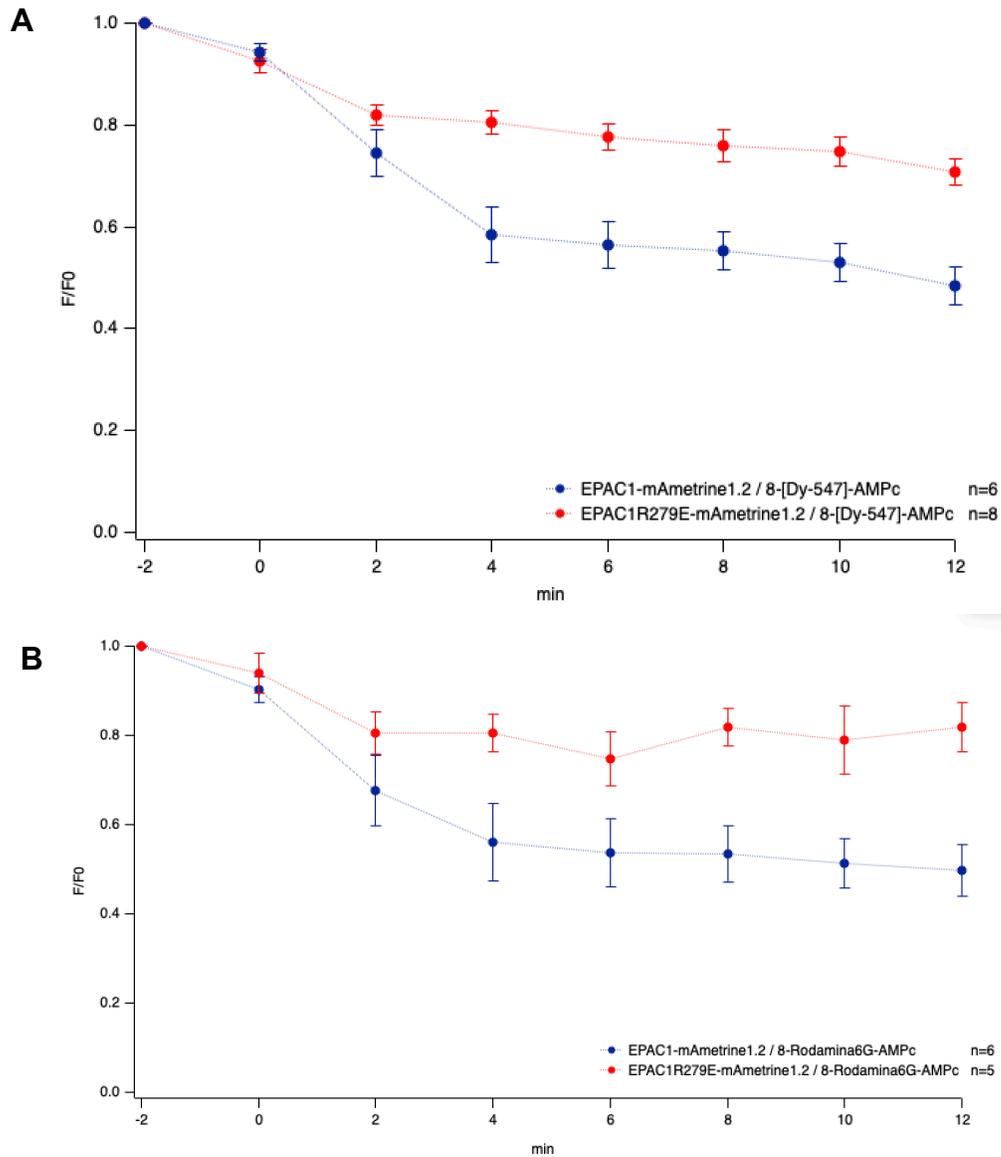


Figura S5. Diseño de la construcción **pcDNA3.1-PalmMyr-EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2** y **pcDNA3.1-PalmMyr-EPAC1R2793<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2**



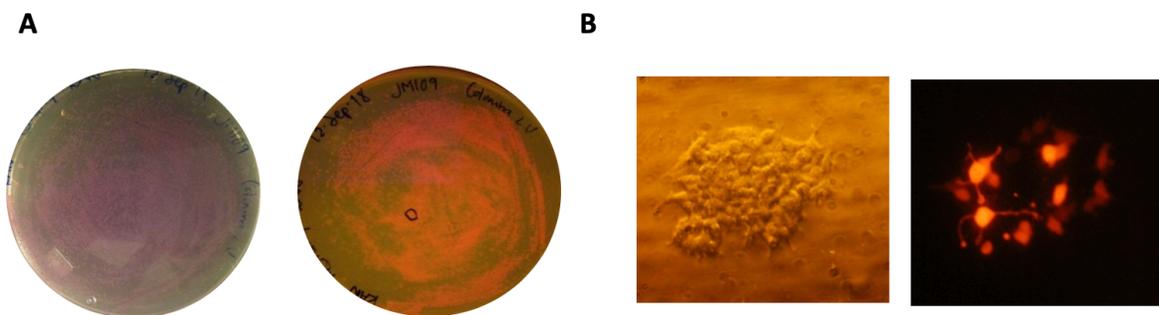
**Figura S6. Disminución de la fluorescencia de las proteínas sin corrección de fotoblanqueo.** En las gráficas se observa la tendencia de la disminución de la fluorescencia de EPAC1<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (WT) y EPAC1R279E<sub>CNBD</sub>-mAmetrine1.2 (mutante) a través del tiempo por FRET *in vivo*. La gráfica **A** se obtuvo utilizando el donador 8-[Dy-5467]-AMPc, la gráfica **B** se obtuvo utilizando el donador 8-Rodamina6G-AMPc. Las barras de cada punto representan el error estándar.

## APÉNDICE

### Confirmación de la expresión de pcDNA3.1(-)Pro-mCherry

El vector pcDNA3.1(-)Pro se diseñó a partir del vector de expresión en mamífero pcDNA 3.1(-) de *Thermo Fisher Scientific*, a diferencia de este, el vector pcDNA3.1(-)Pro se puede expresar en células procariontes ya que consta de un sitio de unión a ribosoma (RBS), el inicio de traducción posterior al promotor T7 y una proteína fluorescente, en este caso mCherry, además de la etiqueta de polihistidinas para la purificación posterior de la proteína fluorescente.

La expresión de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-mCherry fue exitosa tanto en células procariontes de *E. coli* en la cepa JM109(DE3) y en células eucariotas HEK293, logrando observar la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 470 nm.



**Apéndice 1.** Expresión de la construcción pcDNA3.1(-)Pro-mCherry. **A** Células procariontes *E. coli* en la cepa JM109(DE3) en campo claro y fluorescencia observadas en luz azul respectivamente. **B** Células eucariotas HEK293 en campo y fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 470 nm.