

Trabajo de Fin de Grado  
Grado en Biotecnología

# Regulación del canal de potasio Kv7.2 por la calmodulina

Estudio del conector de las hélices A y B en el dominio citoplasmático C-terminal

Autor:  
Iñigo Bañales Belaunde  
Director:  
César Augusto Martín Plágaro  
Co-Director:  
Álvaro Villarroel

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. CANAL DE POTASIO KV7.2 (KCNQ2)</b> .....	1
<b>1.2. REGULACIÓN POR CALMODULINA Y CALCIO</b> .....	2
<b>1.3. FRET</b> .....	3
<b>1.4. ENSAYOS PREVIOS</b> .....	4
<b>1.5. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	5
<b>2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	5
<b>2.1.1. Construcciones y plásmidos</b> .....	5
<b>2.1.2. PCR mutagénica</b> .....	6
2.1.2.1. Transformación de bacterias .....	7
2.1.2.2. Extracción de ADN plasmídico .....	8
2.1.2.3. Chequeos .....	9
2.1.2.4. Secuenciación.....	9
<b>2.1.3. Digestiones</b> .....	9
2.1.3.1. Purificación de ADN extraído de geles de agarosa.....	10
2.1.3.2. Ligaciones .....	10
2.1.3.3. Transformación de bacterias .....	10
2.1.3.4. Extracción de ADN plasmídico .....	10
2.1.3.5. Chequeos .....	11
2.1.3.6. Secuenciación.....	11
<b>2.2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS</b> .....	11
<b>2.2.1. Cotransformación</b> .....	11
<b>2.2.2. Crecimiento de bacterias e inducción</b> .....	12

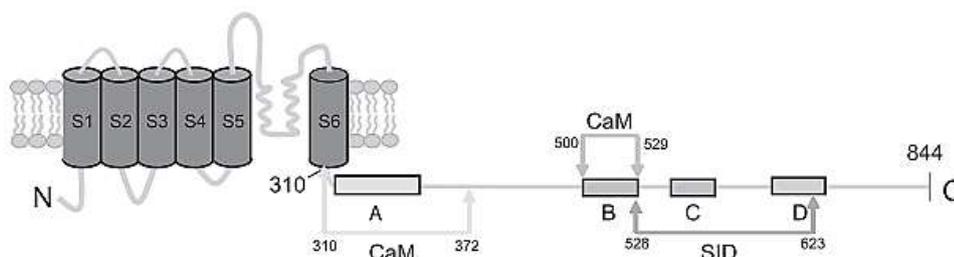
2.2.3. Lisis y electroforesis .....	12
<b>2.3. PURIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Crecimiento de bacterias e inducción.....	13
2.3.2. Lisis celular .....	14
2.3.3. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados .....	14
2.3.4. Diálisis .....	15
2.3.5. Cromatografía de exclusión molecular .....	15
<b>2.4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA.....</b>	<b>15</b>
2.5.1. Preparación de las muestras .....	15
2.5.2. Medidas de FRET .....	16
2.5.3. Cálculo de las distancias entre fluoróforos .....	16
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	17
3.2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS .....	18
3.4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).....	19
3.5. DISTANCIAS ENTRE FLUORÓFOROS .....	19
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO 1. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO CAM/KV7.2 CON MTFP y VENUS .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 2. ESPECTROS DE EMISIÓN POR FRET .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 3. ESPECTROS DE EMISIÓN DE VENUS .....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. CANAL DE POTASIO KV7.2 (KCNQ2)

La familia de canales de potasio dependientes de voltaje Kv7 consta de cinco miembros (Kv7.1-5) con un papel crucial en la excitabilidad cerebral y cardíaca (Schwake *et al.*, 2006). En este proyecto se va a trabajar con la subunidad Kv7.2, expresada de forma mayoritaria en el sistema nervioso, donde junto con Kv7.3 cumple una importante función como principal mediador de la conocida como “corriente M” reguladora de la excitabilidad neuronal (Brown 1988; Marrion 1997).

Los canales Kv7 son tetrámeros de subunidades con seis segmentos transmembrana cada una (S1-S6), y extremos N y C terminales intracelulares de longitud variable (**Figura 1**). El poro está constituido por los segmentos S5-S6, mientras que los segmentos S1-S4 forman el dominio sensor de voltaje. El dominio C-terminal (300-500 residuos) es clave en la regulación y función de Kv7.2, puesto que contiene los dominios requeridos para el ensamblaje en homo o heterotetrámeros (SID), así como para la unión de una red compleja de moléculas que interactúan entre sí, entre las que destacan el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) y la calmodulina (CaM), ambas necesarias para la función del canal (Ambrosino *et al.*, 2015).



**Figura 1. Representación de la subunidad Kv7.2.** Los segmentos transmembrana S1-S4 constituyen el sensor de voltaje, y los segmentos S5-S6 el poro. En el extremo C-terminal se encuentran cuatro regiones helicoidales (hélices A-D) que son clave en la función y regulación del canal. Se indican el lugar de unión a CaM (hélices A y B) y el dominio de interacción de subunidades (SID) necesario para la formación de tetrámeros (hélices C y D). (Etxeberria *et al.*, 2008).

El análisis de la estructura secundaria del extremo C-terminal reveló cuatro regiones helicoidales (hélices A-D). Mientras que las hélices A y B son altamente conservadas entre los miembros de la familia Kv7, las hélices C y D son regiones más divergentes

(Yus-Nájera *et al.*, 2002). En contraste con las hélices A, B y C, la hélice D parece ser prescindible para la función del canal (Nakajo y Kubo, 2008; Schwake *et al.*, 2006).

## 1.2. REGULACIÓN POR CALMODULINA Y CALCIO

La calmodulina (CaM) forma parte de la gran familia de proteínas con dominios de unión EF, las cuales son importantes sensores de calcio en las células eucariotas con multitud de funciones en la regulación de proteínas (enzimas, transportadores de membrana, canales iónicos...). Se trata de una proteína pequeña (148 aminoácidos, 16.706 Da), soluble, termoestable y ácida. Estructuralmente presenta dos dominios globulares, los lóbulos N y C, responsables de la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y conectados entre sí por una región central flexible. Su gran habilidad para interactuar con un gran número de proteínas es debida a su flexibilidad estructural (Alaimo y Villarroel, 2018).

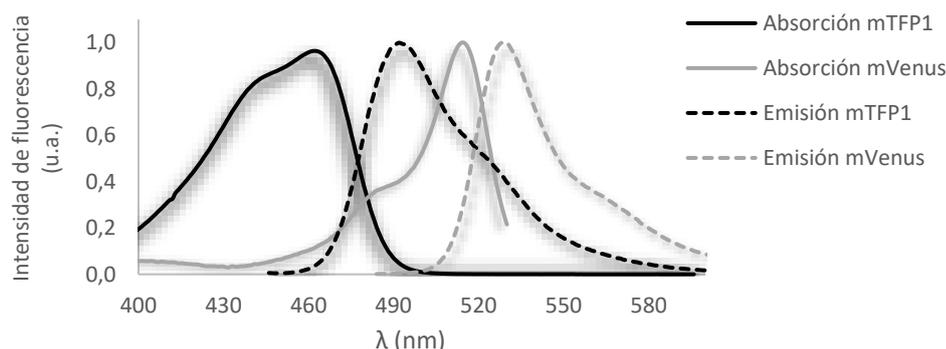
El dominio de unión a CaM de los canales Kv7 consta de dos regiones discontinuas, una localizada en la hélice A (motivo IQ) y otra en la hélice B (Yus-Nájera *et al.*, 2002), separadas por un conector flexible de 157 residuos. No obstante, otra zona entre ambas hélices (“hélice TW”) también podría ayudar estabilizando la unión a CaM (Gomis-Perez *et al.*, 2015).

La apertura y el cierre del canal de potasio están regulados por el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con la mediación de CaM. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el interior celular oscila entre 100 nM (células en reposo) y 1-10  $\mu\text{M}$  (aumento en respuesta a señales eléctricas o químicas). Aunque la regulación por CaM de los canales iónicos es un proceso bien conocido termodinámicamente, no fue hasta hace poco cuando se descifró el mecanismo estructural de la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de Kv7.2 (Bernardo-Seisdedos *et al.*, 2018). La interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM origina un cambio conformacional en los lóbulos de CaM, lo que se traduce en una reorientación de las hélices A y B del canal Kv7.2 que en último término provoca el cierre del poro y la inhibición de la corriente M. Esta interacción es objeto de estudio para multitud de grupos de investigación, pues su disfuncionalidad es clave en la aparición de las epilepsias neonatales familiares benignas (BNFE). Mutaciones que afectan a dicha unión han sido propuestas como responsables de estas patologías (Alaimo *et al.*, 2018).

Permanece de momento incierto el posible papel que pueda tener en este proceso el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ), un fosfolípido de membrana crucial en la señalización celular al interactuar directamente con las proteínas de membrana, incluidos los canales Kv.7 (Zaydman y Cui, 2014). Es necesario para la activación y función normal de los canales Kv7.1-5 (Suh *et al.*, 2006), y su agotamiento tras la hidrólisis por la fosfolipasa C es responsable de su inhibición (Zhang *et al.*, 2003). Se desconoce exactamente su mecanismo de acción, si bien algunos estudios han situado su lugar de unión a los canales Kv7.2-4 en el conector entre las hélices A y B (Hernandez *et al.*, 2008). De hecho, hay datos que apoyan una interdependencia con CaM, con esta modulando la sensibilidad a  $\text{PIP}_2$  (Alberdi *et al.*, 2015).

### 1.3. FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es un fenómeno físico en el que un fluoróforo donador en su estado excitado transfiere su energía de excitación (sin emitir radiación) a un fluoróforo aceptor, originando que este emita su fluorescencia característica. Las condiciones para que el FRET tenga lugar son: (1) las moléculas aceptoras y donadoras deben estar próximas entre sí (10-100 Å) y (2) el espectro de absorción del aceptor debe solaparse con el espectro de emisión de fluorescencia del donador (**Figura 2**) (Bajar *et al.*, 2016).



**Figura 2. Espectros de absorción y emisión de las proteínas fluorescentes mTFP1 y mVenus.** En negro se indican los espectros de mTFP1 y en gris los de mVenus. Las líneas continuas hacen referencia a los espectros de absorción y las discontinuas a los de emisión. El espectro de emisión de mTFP1 (donador) se solapa con el espectro de absorción de mVenus (aceptor) (Ai *et al.*, 2006; Kremers *et al.*, 2006) (u.a.: unidades arbitrarias)

En el FRET intramolecular, los fluoróforos donadores y aceptores se encuentran en la misma molécula, de modo que cambios conformacionales en ella inducen alteraciones

en el FRET. Dado que este fenómeno es extremadamente sensible a la distancia entre el donador y el aceptor, se ha adoptado este método para monitorizar multitud de procesos moleculares, como las interacciones proteína-proteína o actividades enzimáticas (Bajar *et al.*, 2016). Se tiende a emplear pares de proteínas fluorescentes conjugadas a extremos opuestos de una molécula para llevar a cabo este tipo de ensayos (Piston y Kremers, 2007).

#### 1.4. ENSAYOS PREVIOS

La unión del complejo CaM-Kv7.2 a calcio induce un cambio conformacional que resulta en la reorientación y separación de las hélices A y B del canal. Este es un fenómeno que se puede seguir mediante los cambios en el FRET intramolecular, puesto que la reorientación conlleva un descenso de la transferencia de energía por resonancia entre fluoróforos situados antes y después de las hélices A y B, y en el que cobra gran importancia el conector entre ambas hélices, una región de gran flexibilidad pero cuya implicación en el proceso se desconoce. El grupo de investigación ya ha llevado a cabo ensayos preliminares con el extremo C-terminal del canal Kv7.2, así como con tres construcciones con deleciones de 24, 49 y 127 aminoácidos (deleciones A, B y C) en el conector entre ambas hélices (**Figura 3.A**), expresándolos con CaM y analizando su reacción al  $\text{Ca}^{2+}$ . El proceso de reorientación se vio afectado en la deleción que eliminaba casi todo el conector. En cambio, en las otras dos, aunque de menor magnitud que con el conector natural, sí que se produjo la reorientación. Los datos reflejaron que el motivo no residía en la longitud del conector, sino en la eliminación de una región implicada en el cambio conformacional en la deleción larga, proponiendo el lugar de unión a  $\text{PIP}_2$  como un potencial factor en la reorientación, aunque sin descartar la posible colaboración de otras regiones.

#### 1.5. OBJETIVOS

A fin de analizar si la región de unión a  $\text{PIP}_2$  está implicada en la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM, en este trabajo se propone partir de la deleción de 49 aminoácidos y obtener nuevas construcciones delecionadas que permitan ayudar a esclarecer este fenómeno.

Los objetivos planteados para ello son:

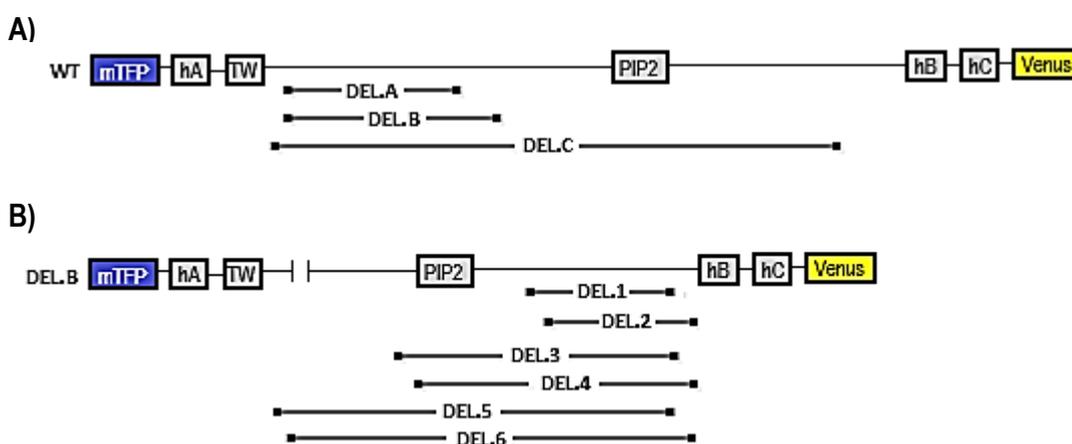
- Construcción de mutantes delecionados mediante técnicas de biología molecular.
- Pruebas de expresión en bacterias.
- Expresión a mayor escala y purificación de los constructos con CaM.
- Observación de la homogeneidad del purificado y la posible formación de agregados proteicos mediante un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS).
- Obtención de las medidas de FRET en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la transferencia de energía por resonancia entre mTFP1 y mcpVenus173.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

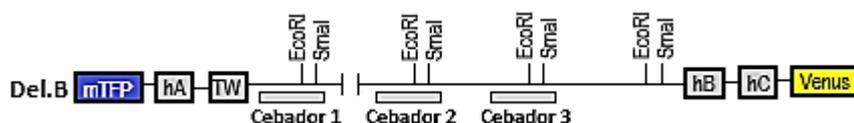
#### 2.1.1. Construcciones y plásmidos

Se diseñaron seis construcciones con distintas longitudes del conector situado entre las hélices A y B del extremo C-terminal del canal Kv7.2 (**Figura 3.B**). Para ello se llevaron a cabo seis deleciones individuales en la deleción B, con 49 aminoácidos menos (I375-A424) respecto al conector natural de 157 aminoácidos. Todas las construcciones constan del fluoróforo mTFP1 (mTFP) en el extremo N-terminal, la hélice A (hA), el conector, la hélice B (hB), la hélice C (hC) y el fluoróforo mcpVenus173 (Venus) en el extremo C-terminal.



**Figura 3. A) Esquema de las deleciones realizadas a partir del extremo C-terminal de Kv7.2 (WT) en ensayos anteriores.** El número de aminoácidos eliminado es 24, 49 y 127 para las deleciones A-C, respectivamente. **B) Esquema de las deleciones realizadas a partir de la deleción B.** El número de aminoácidos eliminado es 18, 24, 47, 53, 81 y 87 para las deleciones 1-6, respectivamente.

El método escogido para llevar a cabo las deleciones consistió en introducir sitios de corte para los enzimas EcoRI y SmaI en distintos puntos del conector, para a continuación realizar las digestiones entre los puntos introducidos artificialmente y los ya presentes en la secuencia del canal y obtener las construcciones delecionadas. Se introdujeron mutaciones de sustitución en tres regiones concretas del conector (**Figura 4**), obteniendo así tres mutantes sustituidos (M1-3), a partir de cada uno de los cuales se llevaron a cabo dos digestiones, una con el enzima EcoRI y otra con el enzima SmaI. De cada mutante se obtuvo por tanto un par de construcciones delecionadas, diferenciadas en 6 aminoácidos.



**Figura 4. Esquema de las mutaciones introducidas en la secuencia de la deleción B.** Se introdujeron, por separado, mutaciones de sustitución en tres zonas del conector entre las hélices A y B. Se empleó para ello PCR mutagénica con pares de cebadores que contenían las mutaciones dando lugar a las construcciones M1-3, con dos puntos de corte para EcoRI y SmaI cada una.

Todas las construcciones mencionadas hasta ahora fueron clonadas en el vector pPROEX HTc, un plásmido bacteriano cuyas principales características son un gen de resistencia al antibiótico ampicilina, gracias al cual se pueden seleccionar las bacterias transformadas con el plásmido, y una cola de histidinas en el extremo N-terminal para facilitar la purificación de la proteína insertada. No obstante, en el caso de la calmodulina, esta se encontraba en el plásmido pOKD4, un vector de baja copia que posee un gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Ambos vectores poseen promotores bacterianos cuya expresión se puede inducir con IPTG (isopropiltiogalactósido), un análogo de la lactosa que se une a la proteína represora LacI, impidiendo su acción.

### 2.1.2. PCR mutagénica

Los puntos de corte nuevos para los enzimas de restricción se introdujeron con el kit de PCR “QuickChange II Site-Directed Mutagenesis” (Agilent Technologies) y el termociclador T100 (Bio Rad). Para conseguir las tres construcciones mutantes se emplearon un par de cebadores por cada una. Cada par de cebadores se une a la misma

secuencia pero en hebras opuestas del plásmido, y contiene asimismo la secuencia de corte para EcoRI (5' G/AATTC 3') y SmaI (5' CCC/GGG 3'), las cuales producen extremos cohesivos y romos, respectivamente. Para las construcciones M1-3 se emplearon los siguientes cebadores (por motivos de simplicidad sólo se incluyen los cebadores que se unen a la hebra molde), de secuencia 5'-GAACGTACCGTTGAATTCCCGGGGTACCGTCTGGCT-3' para M1, 5'-GACTCTCCGTCTGAATTCCCGGGATCTTGGTCTTTC-3' para M2 y 5'-CGTCAGAACTCTGAATTCCCGGGTCTGCCGGGTGAA-3' para M3. La mezcla de reacción empleada, con un volumen final de 20 µL, se muestra en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Mezcla de reacción para la PCR mutagénica.** El volumen total de reacción es 20 µL.

Tampón de reacción	de 10 x	ADN Del.B (100 ng/µL)	Cebador 5'-3' (10 µM)	Cebador 3'-5' (10 µM)	dNTPs (2,5 mM)	Polimerasa PFU (2,5 U/µL)	H <sub>2</sub> O
2 µL		0,5 µL	1 µL	1 µL	2 µL	0,4 µL	13,1 µL

Tras finalizar la PCR, se digirió el ADN parental (metilado y hemimetilado) con 1 µL de la enzima de restricción DpnI (37 °C/12 h), cuya secuencia diana es 5' G<sup>m</sup>A/TC 3', donde la adenina se encuentra metilada. Por último se procedió a transformar los productos de la PCR en bacterias competentes, para a continuación extraer el ADN plasmídico de las mismas y realizar chequeos enzimáticos para comprobar que los sitios de corte habían sido correctamente introducidos.

#### 2.1.2.1. Transformación de bacterias

Por ello, a continuación se transformaron bacterias *Escherichia coli* BSJ competentes con los productos de PCR mediante el método del cloruro cálcico. En primer lugar, trabajando en condiciones de esterilidad, se mezclaron, en el siguiente orden, 45 µL de tampón de transformación (2,22 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,11 mM CaCl<sub>2</sub>), 5 µL de producto de PCR y 100 µL de bacterias competentes. Las mezclas de reacción se incubaron 20 minutos en hielo, para a continuación mantenerlas 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de medio LB (Luria-Bertani) (Laboratorios Conda) estéril a las mezclas de reacción y se incubaron a 37 °C durante 40 minutos. Después se centrifugaron las muestras (14.500 rpm/1 minuto) en la centrífuga MiniSpin (Eppendorf) y se desechó todo el sobrenadante salvo aproximadamente 150 µL. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron suavemente en dicho volumen y

se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico ampicilina. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas hasta que aparecieron colonias.

#### 2.1.2.2. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico requirió picar previamente colonias de las placas donde se sembraron las bacterias transformadas con los productos de PCR. Para ello, en condiciones de esterilidad, se picaron varias colonias de cada placa con palillos estériles y se introdujeron en tubos de 13 mL estériles con tapón de ventilación (Sarstedt) que contenían 3 mL de medio LB estéril y 3 µL de ampicilina. Estos tubos se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 12 horas en el incubador Certomat BS-1 (Sartorius). Es importante no dejar creciendo las bacterias menos de 8 horas porque no habría suficiente número de células como para garantizar un rendimiento bueno en la extracción de ADN, ni más de 16 horas, puesto que las bacterias correrían el riesgo de entrar en la fase de muerte y lisis.

A continuación se llevó a cabo una minipreparación de ADN plasmídico por el método alcalino. Para empezar, en esterilidad, se añadieron 2 mL de cultivo en tubos eppendorf y el resto se almacenó a 4 °C. Los tubos se centrifugaron (14.500 rpm/1 minuto) en la centrífuga MiniSpin, tras lo cual se eliminó el sobrenadante al vacío y las bacterias se resuspendieron en 150 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) contra gradilla. Después se añadieron 150 µL de solución de lisis (1 % SDS, 0,2 M NaOH) y se voltearon los tubos dos veces. Una vez hecho esto, se añadieron 150 µL de sales de neutralización (3M acetato potásico, 5M ácido acético) y 80 µL de fenol/cloroformo. Las muestras a continuación se mezclaron bien con el agitador lab dancer (IKA) y se centrifugaron (14.500 rpm/4 minutos). Del sobrenadante se tomaron 400 µL y se añadieron a un nuevo tubo eppendorf con 200 µL de isopropanol, volviendo a centrifugar (14.500 rpm/4 minutos). Por último, se retiró el sobrenadante al vacío, se lavó el precipitado con 200 µL de etanol 70 % y se dejó evaporar del todo durante 20 minutos. Una vez seco, se resuspendió el precipitado en 30 µL de tampón TE con RNAsa (50 µg/mL).

### 2.1.2.3. Chequeos

Con el objetivo de verificar que se habían introducido correctamente los puntos de corte, se procedió a realizar chequeos de las minipreparaciones de ADN con los enzimas BglI y EcoRI (Thermo Fischer) según el protocolo de la **Tabla 2**, con un volumen de reacción total de 20  $\mu\text{L}$ . Las mezclas de reacción se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  (temperatura óptima de actividad de ambas enzimas) durante 3 horas y posteriormente se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8), con un voltaje de 120 V durante 45 minutos. Las muestras se cargaron junto con 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (50 % glicerol, 0,2 M EDTA, 0,05 % azul de bromofenol, pH 8), y como marcador se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de ADN del fago  $\lambda$  digerido con BstEII (Thermo Fischer).

**Tabla 2. Protocolo de chequeo enzimático.** El volumen total de reacción es 20  $\mu\text{L}$ .

ADN	Tampón O <sup>+</sup>	BglI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	EcoRI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O
1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{L}$	16,6 $\mu\text{L}$

### 2.1.2.4. Secuenciación

Como paso último, la verificación definitiva de que las construcciones que habían mostrado un patrón correcto en el gel de agarosa habían sido mutadas correctamente (sin introducción de mutaciones puntuales en el conector indeseadas en la PCR) se llevó a cabo mediante el servicio de secuenciación de la empresa Secugen (Madrid, España). Para ello se enviaron, por cada clon positivo, una muestra con 1,5  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico, 1,5  $\mu\text{L}$  de cebador y 12  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O. Como cebador para la secuenciación se empleó un oligonucleótido que se unía a la hebra molde, en concreto en la parte final de la secuencia del fluoróforo mTFP1, previa a la hélice A del canal.

### 2.1.3. Digestiones

Una vez obtenidas las construcciones con los sitios de corte nuevos para EcoRI y SmaI, se llevaron a cabo digestiones para obtener los mutantes delecionados. De este modo, a partir de M1 se obtuvieron las deleciones 5 y 6, a partir de M2, las deleciones 3 y 4 y a partir de M3, las deleciones 1 y 2. Se prepararon mezclas de reacción con los componentes que se muestran en la **Tabla 3** y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$ , en el caso de las

digestiones con EcoRI, y a 30 °C, en el caso de las digestiones con SmaI, durante 12 horas.

**Tabla 3. Protocolo de digestión enzimática.** El volumen total de reacción es 20 µL.

ADN	Tampón EcoRI/SmaI	EcoRI/SmaI (10 U/µL)	H <sub>2</sub> O
1 µL	2 µL	0,5 µL	16,5 µL

#### 2.1.3.1. Purificación de ADN extraído de geles de agarosa

Antes de recircularizar el plásmido, fue necesario migrar los productos digeridos en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TBE (120 V/40 minutos) para separar el fragmento digerido del vector y así poder extraer este último. La purificación del ADN del vector fue llevada a cabo mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fischer).

#### 2.1.3.2. Ligaciones

Una vez purificados los vectores del gel de agarosa, se recircularizaron por medio de la ligasa T4 en presencia de su tampón T4 (335 mM Tris-HCl, 33 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 84 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,8). Las mezclas de reacción se prepararon con los volúmenes de la **Tabla 4** y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas.

**Tabla 4. Protocolo de ligación con ligasa T4.** El volumen total de reacción es 10 µL.

ADN vector	Tampón T4 ligasa	Ligasa T4
8,5 µL	1 µL	0,5 µL

#### 2.1.3.3. Transformación de bacterias

A continuación se transformaron bacterias *Escherichia coli* BSJ competentes con los productos de la ligación mediante el método del cloruro cálcico.

#### 2.1.3.4. Extracción de ADN plasmídico

Una vez crecidas las colonias bacterianas, se picaron en tubos estériles de 13 mL con tapón de ventilación y 3 mL de medio LB y 3 µL del antibiótico ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 12 horas con agitación (180 rpm) en el incubador Certomat

BS-1. A partir de estas colonias crecidas en medio líquido se llevaron a cabo minipreparaciones de ADN plasmídico por medio del método alcalino.

#### 2.1.3.5. Chequeos

Estas preparaciones de ADN plasmídico fueron chequeadas enzimáticamente con EcoRI y BglII para comprobar que se habían llevado a cabo exitosamente las digestiones. Para ello se prepararon mezclas de reacción según lo dispuesto previamente en la **Tabla 2** y se incubaron durante 3 horas a 37 °C, para a continuación ser sometidas a una electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TBE, con un voltaje de 120 V durante 45 minutos.

#### 2.1.3.6. Secuenciación

Las muestras de ADN que dieron un resultado positivo en el chequeo fueron enviadas al servicio de secuenciación de Secugen para verificar que todo había transcurrido correctamente.

## **2.2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS**

Una vez conseguidas las construcciones delecionadas, se procedió a analizar su expresión al cotransformar las construcciones con CaM.

### **2.2.1. Cotransformación**

Dada la escasa eficacia de la transformación por el método del cloruro cálcico en la introducción de dos plásmidos simultáneamente en bacterias, para cotransformar las construcciones junto con CaM se empleó la electroporación.

Para ello se emplearon bacterias *Escherichia coli* BL21 electrocompetentes (resuspendidas en un tampón sin iones). En condiciones de esterilidad se mezclaron, en una cubeta de electroporación de 2 mm (Bio Rad), 50 µL de bacterias, 0,5 µL de las construcciones delecionadas (1µg/µL) y 2 µL de CaM (0,25 µg/µL) (0,5 µg de cada vector). A continuación se situaron las cubetas en el electroporador Gene Pulser Xcell (Bio Rad) y se sometieron a un pulso de 5-5,5 ms (2500 HV, 200 Ω y 25 µF). Después se añadió 1 mL de cultivo LB a la cubeta de electroporación y la mezcla se pasó a un

tubo eppendorf, el cual se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo, se centrifugaron (14.500 rpm/1 minuto) en la centrífuga MiniSpin, para finalmente retirar la mayoría del sobrenadante, resuspender las bacterias en 150 µL restantes y sembrarlas en placas de agar-LB con los antibióticos ampicilina y kanamicina. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas, hasta la aparición de colonias.

### **2.2.2. Crecimiento de bacterias e inducción**

Se picaron 4 colonias por cada una de las placas y se introdujeron en tubos de 13 mL con ventilación, con 3 mL de medio LB y 3 µL de los antibióticos correspondientes. Estos cultivos se dejaron crecer durante 12 horas a 37 °C y con agitación hasta conseguir cultivos saturados. Pasadas las 12 horas, se hicieron diluciones 1:100 de los cultivos, introduciendo 100 µL de los mismos en un tubo Falcon de 50 mL (Sarstedt) con 10 mL de medio LB y 10 µL de ampicilina y de kanamicina, este último sólo en los casos de las bacterias cotransformadas. Estos nuevos cultivos se incubaron a 37 °C en un incubador orbital hasta conseguir una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8, medida con el espectrofotómetro Jenway 6300 (ICT SL). Alcanzado este punto, se indujeron los cultivos con 0,5µL de IPTG/mL de cultivo, no sin antes guardar 1 mL de cada cultivo no inducido para cargarlo más adelante en el gel de electroforesis. Tras 3 horas de inducción, se centrifugaron los cultivos (5.500 rpm/10 minutos) en la centrífuga 5430r (Eppendorf), para a continuación retirar el sobrenadante y resuspender las bacterias en el pequeño volumen no desechado. Este volumen se introdujo a continuación en tubos eppendorf que se centrifugaron (7.500 rpm/5 minutos) en la centrífuga MiniSpin, para finalmente retirar el sobrenadante.

### **2.2.3. Lisis y electroforesis**

Continuando con el protocolo, y manteniendo siempre las muestras en hielo, las bacterias se resuspendieron en 500 µL de tampón de lisis enriquecido (120 mM KCl, 50 mM Hepes, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1mM PMSF, inhibidores de proteasas sin EDTA, 10 µg de lisozima, 500 µM DTT, pH 7,4). El DTT se emplea como un agente reductor que evita la formación de enlaces disulfuro intra e intermoleculares. A continuación se llevó a cabo la lisis de las bacterias con el desintegrador de ultrasonidos Soniprep 150 (MSE) en 3 ciclos de 10 segundos de actividad y 5 segundos

de reposo. Posteriormente las muestras se centrifugaron (14.500 rpm/10 minutos) en la centrífuga MiniSpin; el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf nuevo (fracción soluble de proteína) y el precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ L de tampón (fracción no soluble de proteína). Ambas fracciones, la soluble y la no soluble, junto con la fracción soluble de la alícuota de cultivo no inducido y el marcador de peso molecular (PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Fisher) fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % con dodecilsulfato sódico (SDS), es decir, en condiciones pseudonativas. Las muestras se prepararon de la siguiente forma: 20  $\mu$ L de cada fracción se mezclaron con 5  $\mu$ L de tampón de ruptura (62,5 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 2% SDS, 5 % DTT, 0,05 % azul de bromofenol, pH 6,8) y de este volumen 15  $\mu$ L se cargaron en el gel de poliacrilamida en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3).

Una vez acabada la electroforesis, los geles fueron observados en el sistema de imagen Versadoc 4000 (Bio Rad), donde se excitaron los fluoróforos de las construcciones (a 488 nm para mTFP1 y 555 nm para mcpVenus173) para observar su fluorescencia, y a continuación se tiñeron los geles con Azul de Coomassie R-250 (BioRad). De este modo, se eligió para purificar cada construcción la colonia de bacterias con mayor nivel de expresión de proteína soluble con CaM.

## **2.3. PURIFICACIÓN**

### **2.3.1. Crecimiento de bacterias e inducción**

Una vez realizadas las pruebas de expresión de las construcciones, se procedió a purificar los constructos delecionados expresados con CaM. Para ello, en primer lugar, fue necesario el crecimiento de las bacterias a una escala mayor a la anterior. Concretamente, se crecieron las bacterias en matraces con 1 L de medio LB con antibióticos. El procedimiento seguido fue análogo al previamente explicado. La diferencia residió en el tiempo de inducción con IPTG, que en este caso fue de 12 horas y a una temperatura de 20 °C. Pasadas las 12 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron (5.500 rpm/10 minutos) en la centrífuga Avanti J-20 XPI (Beckman Coulter) con el rotor JLA 9.100. La cantidad de proteína en el precipitado bacteriano

de 1 L de cultivo es más que suficiente para realizar el ensayo. Por tanto, la purificación se llevó a cabo a partir de la mitad del mismo, conservando lo restante a -20 °C.

### **2.3.2. Lisis celular**

Manteniendo siempre las muestras en hielo, se resuspendieron las bacterias en 25 mL de tampón de unión enriquecido (120 mM KCl, 10 mM K-HEPES, 5 mM imidazol, 5 % glicerol, 1 mM PMSF, inhibidores de proteasas sin EDTA, 20 µg/mL de lisozima, pH 7,4). A continuación se lisaron las células con el homogeneizador por alta presión Avestin Emulsiflex C5 (ATA Scientific Instruments), tras lo cual se centrifugaron (25.000 g/35 minutos) los lisados para separar las fracciones solubles y no solubles en la centrífuga Avanti J-20 XPI con el rotor JA 2550. El precipitado se desechó, mientras que se continuó la purificación con el sobrenadante (fracción soluble). Dicho sobrenadante se filtró (selectividad de 0,2 µm) como paso previo a la cromatografía de afinidad.

### **2.3.3. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados**

Las muestras se sometieron en primer lugar a una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, gracias a la cola de histidinas N-terminal presente en todas ellas. El sistema de cromatografía empleado fue el AKTA purifier (GE Healthcare), en el que se situó la columna HiTrap de 5 mL (GE Healthcare) con cobalto inmovilizado. Todos los tampones empleados fueron filtrados previamente a su uso.

Para empezar, tanto la columna como el sistema de cromatografía, ambos mantenidos a 4 °C, fueron lavados con agua destilada para eliminar el etanol (20 %) en que se conservan con el fin de evitar contaminaciones. A continuación fueron equilibrados con tampón de unión (120 mM KCl, 10 mM K-HEPES, 5 mM imidazol, 5 % glicerol, pH 7,4), y posteriormente se inyectó la muestra en la columna (5 mL). Después se lavó la columna con tampón de lavado (120 mM KCl, 10 mM K-HEPES, 5 % glicerol, pH 7,4) para eliminar las interacciones de proteínas inespecíficas y finalmente se eluyó el complejo de interés con tampón de elución (120 mM KCl, 10 mM K-HEPES, 300 mM imidazol, 5 % glicerol, pH 7,4), el cual contiene imidazol que compite con la cola de histidinas en la unión a los metales, y se fueron recogiendo alícuotas de 1 mL hasta la total elución del complejo proteico. La columna se lavó con agua, se regeneró con

tampón de regeneración (20 mM MES, pH 5) y se conservó en etanol (20%) una vez acabada la cromatografía.

#### **2.3.4. Diálisis**

A continuación se llevó a cabo una diálisis con una membrana con selectividad de 20 kDa frente a 2 L de tampón de fluorescencia (120 mM KCl, 50 mM HEPES, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 500  $\mu$ M DTT) durante 12 horas a 4 °C.

#### **2.3.5. Cromatografía de exclusión molecular**

Como tercer paso de purificación, y con el objetivo de eliminar los agregados de proteína formados, se sometieron las muestras a una cromatografía de exclusión molecular en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare), con un rango de separación entre 10 y 600 kDa y una selectividad óptima entre 30 y 250 kDa. Como sistema de cromatografía se empleó de nuevo el AKTA purifier, y asimismo se filtraron todos los tampones antes de su uso.

Una vez lavada la columna con agua destilada para eliminar el etanol (20 %) en que se conserva, esta se equilibró con tampón de fluorescencia. La muestra, previamente filtrada (selectividad de 0,2  $\mu$ m) se inyectó en la columna. A medida que la muestra eluía se fueron recogiendo alícuotas de 1 mL, y una vez acabada la elución se lavó la columna primero con agua destilada y finalmente con etanol (20 %).

### **2.4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)**

Con la intención de verificar que las fracciones eluidas de proteína no contenían agregados se analizó la distribución de tamaños de las partículas presentes con el equipo de dispersión de luz dinámica Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical).

### **2.5. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA**

#### **2.5.1. Preparación de las muestras**

La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia de mcpVenus173 (se podría haber empleado igualmente mTFP1) a 515 nm y utilizando la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 1**):

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot C \cdot L \quad (1)$$

C es la concentración (M),  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (92.200 L/ (mol · cm) para mcpVenus173) y L es el paso óptico (1 cm).

Se prepararon muestras con 0,5  $\mu\text{M}$  de proteína en tampón de fluorescencia y  $\text{Ca}^{2+}$  libre en un rango de concentraciones desde 0 a 10  $\mu\text{M}$  (rango fisiológico). El tampón contenía EGTA (agente quelante), por lo que los cálculos realizados para preparar las muestras tuvieron en cuenta que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$  no era igual a la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ . La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  pudo inducir la formación de agregados, por lo que las muestras se centrifugaron (20.000 g/10 minutos) y se pasaron a nuevos tubos eppendorf.

### 2.5.2. Medidas de FRET

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en el espectrofluorímetro Aminco SLM 8100. Se emplearon cubetas de cuarzo de 3 mm de paso óptico y 100  $\mu\text{L}$  de volumen. Para obtener las medidas de FRET en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se excitó el fluoróforo mTFP1 a 458 nm y se recogió el espectro de emisión de 470 nm a 570 nm. Dado que a 458 nm no se excita mcpVenus173, la emisión de fluorescencia por parte de este fue debida a la transferencia de energía por resonancia desde mTFP1. De este modo se buscó ver los cambios en el FRET como consecuencia de la reorientación de las hélices A y B, fruto a su vez de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM y la reorganización de sus lóbulos. La transferencia de energía mediante FRET se determinó como el ratio entre la emisión a 490-495 nm de mTFP1 y la emisión a 525-530 nm de mcpVenus173. Por otra parte, se recogió el espectro de emisión de mcpVenus173 entre 525 y 570 nm ante una excitación de 515 nm, con el objetivo de asegurar que la emisión de fluorescencia no descendía por el descenso del pH ante concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

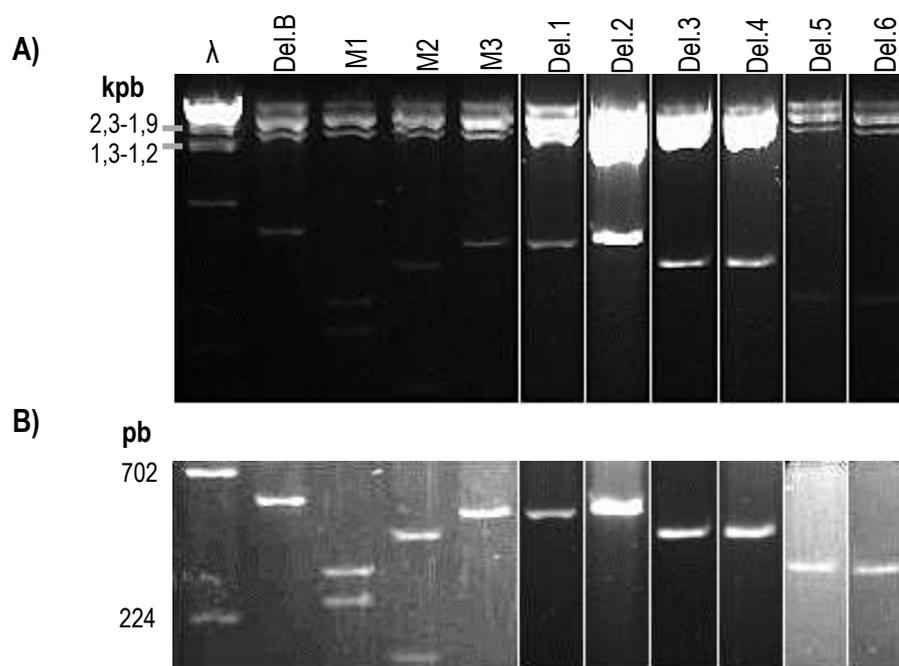
### 2.5.3. Cálculo de las distancias entre fluoróforos

Dado que los cambios en la transferencia de energía por resonancia no son lineales, se calcularon las distancias entre los fluoróforos a partir de los ratios de FRET mediante una serie compleja de ecuaciones (Vogel *et al.*, 2014).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

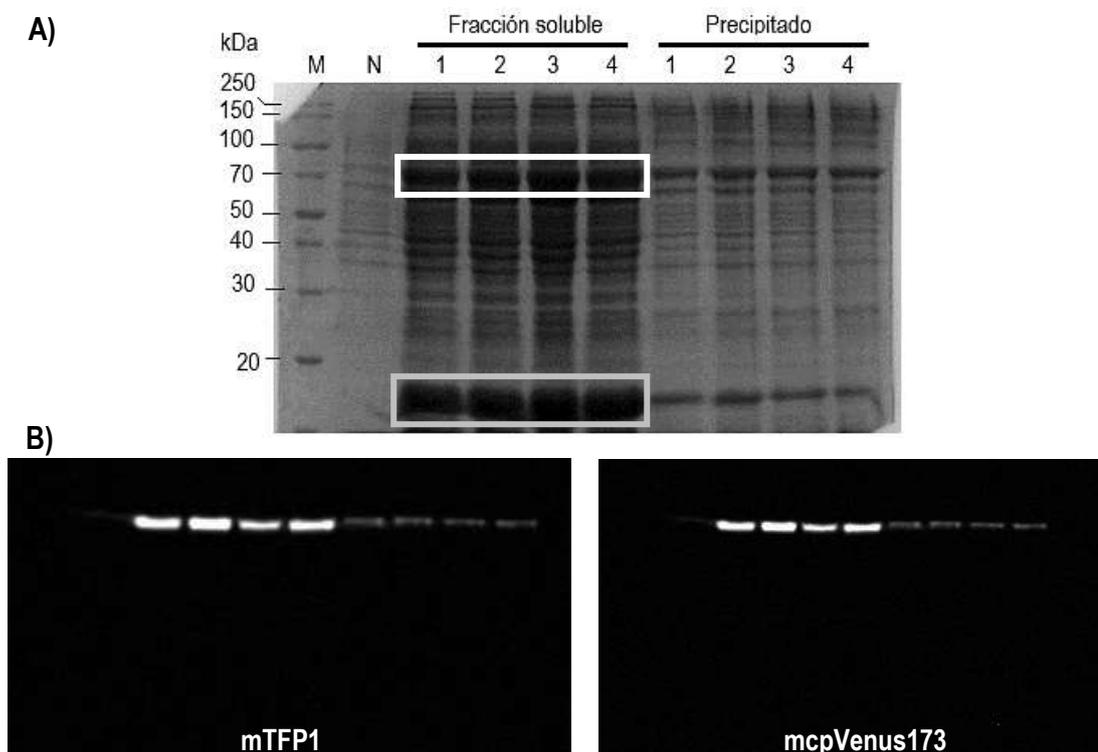
Los resultados de los chequeos enzimáticos de las construcciones resultado de los pasos de la PCR mutagénica y las digestiones con EcoRI y SmaI se muestran en la **Figura 5**. En todas se esperaba obtener tres bandas superiores de 2425, 2130 y 1640 pb, mientras que en el primer caso, se esperaban bandas inferiores para M1 de 313 y 242 pb, para M2 de 414 y 141 pb y para M3 de 502 y 52 pb. En el segundo caso, el tamaño de las bandas inferiores esperado era de 501, 414 y 312 pb para las parejas de deleciones 1-2, 3-4 y 5-6, respectivamente. En el caso de la construcción de partida (delección B), incluida para comparar correctamente los tamaños, la banda inferior esperada era de 555 pb. Cabe destacar que en la calle de M3 no se observa la banda de 52 pb, de un tamaño tal que se escapa fácilmente del gel. En el resto los tamaños de las bandas corresponden con lo esperado. Todo ello fue corroborado gracias a los análisis de secuenciación.



**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % migrado durante 45 minutos a 120 V de los chequeos enzimáticos de las construcciones.** La calle  $\lambda$  corresponde al marcador de peso molecular de ADN del fago  $\lambda$ . **A) Imagen del gel sin modificar.** Se pueden observar las tres bandas superiores de 2425, 2130 y 1640 pb. **B) Ampliación de la zona inferior del gel.** Se ha aumentado el tiempo de exposición y el brillo para facilitar la observación de las bandas inferiores. El orden de las calles Del.1-6 ha sido alterado para facilitar la comprensión de los resultados.

### 3.2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS

En la **Figura 6** se muestran los resultados de la coexpresión en bacterias del constructo delecionado 5 (69, 6 kDa) con CaM a modo de ejemplo. Se incluye tanto el gel teñido con Azul de Coomassie como el gel observado en el sistema de imagen Versadoc 4000, con el que se excitaron los fluoróforos de las construcciones (a 488 nm para mTFP1 y 555 nm para mcpVenus173) para observar su fluorescencia (el SDS no llega a desnaturar por complejo los fluoróforos, que conservan su fluorescencia). Se observa cómo la coexpresión con CaM (16,7 kDa) ayuda a formar un complejo soluble. La proteína de interés (Del.5) aparece en la fracción soluble en las cuatro colonias con las que se realizó la prueba de expresión. Así lo demuestran la banda correspondiente a un tamaño de aproximadamente 70 kDa en el gel teñido y la fluorescencia observada al excitar sus dos fluoróforos. En la parte inferior aparece una banda abundante correspondiente a la calmodulina (16,7 kDa). Las condiciones pseudonativas del gel provocan que el complejo con CaM se disocie.



**Figura 6.** Gel de electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) con SDS (SDS-PAGE) de las pruebas de expresión en bacterias de Del.5-CaM. A) Gel teñido con el colorante Azul de Coomassie. B) Gel observado con el sistema de imagen Versadoc 4000, con el que se excitó mTFP1 a 488 nm y mcpVenus173 a 555 nm. En el recuadro blanco se indica la banda correspondiente a la deleción 5 y en el gris la banda correspondiente a CaM. La calle N corresponde a la fracción soluble de una muestra recogida antes de inducir con IPTG. La calle M corresponde al marcador de peso molecular de proteínas

Aunque se llevó a cabo el análisis de la expresión del constructo con la delección 2, su purificación no se pudo llevar a cabo por falta de tiempo. Por tanto, a partir de aquí se excluye del resto de resultados.

### 3.4. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

A continuación se incluye la tabla con las medidas del equipo de dispersión de luz dinámica (**Tabla 5**). Se indica el porcentaje en volumen de partículas de la muestra correspondiente a los picos de los complejos entre las delecciones y CaM (diámetro aproximado de 10 nm) y de agregados proteicos (diámetro mayor de 100 nm). El tamaño promedio de los complejos se estima en base al tamaño del complejo CaM/Kv7.2 con los fluoróforos (**Anexo 1**). Se observa que aunque se produce la formación de agregados proteicos en las muestras purificadas, estos se mantienen en porcentajes de volumen bajos. Pese a ello, es importante no olvidar que tras la preparación de las muestras con  $\text{Ca}^{2+}$  para las medidas de FRET se pudieron formar agregados, aunque se realizó una centrifugación posterior precisamente para eliminarlos.

**Tabla 5. Datos del porcentaje en volumen de complejo Del-CaM y de agregados en cada muestra, medidos por medio del equipo de dispersión de luz dinámica.** Se indican los datos de los picos correspondientes al complejo con la calmodulina y a los agregados proteicos.

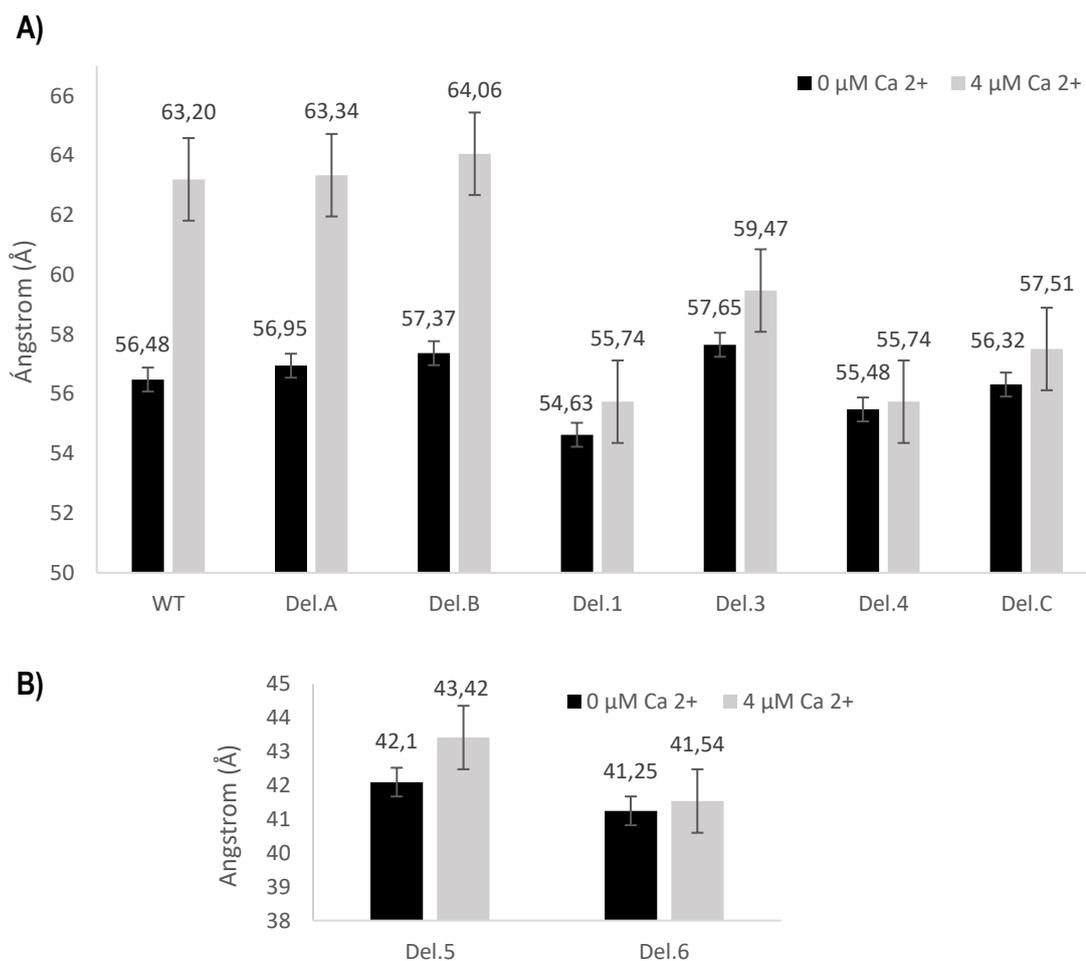
Muestra	Del.-CaM ( $\approx 10$ nm)	Agregados ( $>100$ nm)
Del.1	97,2 %	2,8 %
Del.3	88,6 %	11,4 %
Del.4	98,3 %	1,7 %
Del.5	99,9 %	0,1 %
Del.6	94,9 %	5,1 %

### 3.5. DISTANCIAS ENTRE FLUORÓFOROS

A continuación se muestran las distancias entre fluoróforos para las delecciones 1-6 coexpresadas con CaM (**Figura 7**) en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $4 \mu\text{M}$ ). Asimismo, con el fin de comparar y entender la magnitud de estas medidas, se incluyen los datos correspondientes a la construcción con el conector natural (WT) y las delecciones A, B y C. Estos últimos datos fueron proporcionados por el grupo de investigación.

En el **Anexo 2** se muestran los espectros de emisión entre 470 nm y 570 nm de mTFP1 y mcpVenus173 ante la excitación de mTFP1 a 458 nm para las delecciones 1-6 con

CaM. La emisión por parte de mcpVenus173 es resultado del FRET desde el fluoróforo donador (mTFP1) al aceptor (mcpVenus173). Asimismo, en el **Anexo 3** se muestran los espectros de emisión de mcpVenus173 entre 525 y 570 nm ante la excitación de este fluoróforo a 515 nm. Se aprecia cómo no se produce una caída de la señal de mcpVenus173 ante cambios en el pH en ninguna de las muestras, indicativo de que el experimento y la toma de medidas transcurrieron correctamente.



**Figura 7. Distancias entre fluoróforos en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $4\mu\text{M}$ ).** **A)** Las construcciones se ordenan de menor a mayor tamaño de deleción. Se incluyen los datos correspondientes al conector natural y a las deleciones A, B y C de ensayos previos, así como a las deleciones de este trabajo. **B)** Datos correspondientes a las deleciones 5 y 6. Estos se muestran separados del resto por las anomalías encontradas en los espectros de emisión de los fluoróforos por FRET y porque la escala del eje de ordenadas es distinta. Se indica la desviación estándar de cada una de las medidas.

## 4. DISCUSIÓN

La regulación por calcio y calmodulina del canal de potasio Kv7.2 es un proceso complejo en el que están involucrados multitud de factores y sobre el que hay muchas

incógnitas. Sí que se sabe que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM asociada al canal conlleva un cambio conformacional de sus lóbulos N y C que a su vez origina una reorientación de las hélices A y B de Kv7.2. Este cambio se transmite hasta el dominio transmembrana, cerrándose el canal e inhibiéndose la corriente M (Bernardo-Seisdedos *et al.* 2018). El proceso se puede cuantificar mediante los cambios en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), que permiten saber la distancia a la que se encuentran los fluoróforos en presencia y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . De este modo, situando un fluoróforo donador previo a la hélice A y un fluoróforo aceptor posterior a la hélice B, se puede observar cómo, tras la reorientación de las hélices A y B, la distancia es incrementada.

En esta regulación cobra vital relevancia el conector de 157 aminoácidos entre las hélices A y B, cuyo papel en el cambio conformacional se desconoce. En ensayos preliminares con el conector natural (WT) y con deleciones de 24, 49 y 127 aminoácidos (deleciones A, B y C), se vio cómo a medida que disminuía la longitud del conector, la reorientación se veía cada vez más afectada. No obstante, este efecto fue muy pequeño en las deleciones A y B, mientras que en la deleción C fue bastante mayor. En un primer momento se pensó que la deleción C poseía un conector demasiado corto para permitir la reorientación, mientras que los conectores de las deleciones A y B eran lo suficientemente largos para permitir el cambio conformacional.

Sin embargo, existía otra hipótesis. Era posible que en la reorientación interviniera un tercer actor que interactuaba con el conector, como el sitio de unión a  $\text{PIP}_2$  o algún otro elemento desconocido por el momento. Según la misma, las dos primeras deleciones no afectarían a esta región, mientras que la deleción larga la eliminaría de forma total o parcial, explicando así la ausencia de cambios en el FRET.

El grupo de investigación diseñó un conector artificial muy flexible de corta longitud con el fin de averiguar si la ausencia de reorientación en la deleción C era debida a la rigidez del conector de la misma o a la eliminación de una región implicada en el cambio conformacional. Los resultados fueron favorables a la segunda alternativa, puesto que apenas se produjeron cambios en el FRET. Se propuso el sitio de unión a  $\text{PIP}_2$ , eliminado en la deleción C, como potencial factor implicado en el proceso.

En línea con estos resultados, en este trabajo se diseñaron una serie de deleciones a partir de la deleción B, en la que aún se producía la reorientación mediada por CaM y  $\text{Ca}^{2+}$ . En ellas se eliminaba el sitio propuesto de unión a  $\text{PIP}_2$  y otras secciones situadas antes y después del conector.

Del análisis de los resultados del trabajo han de substraherse las deleciones 5 y 6 coexpresadas con CaM. En ellas la distancia entre fluoróforos era excesivamente pequeña, lo que contrastaba notablemente con los datos obtenidos con la deleción C, una deleción diferenciada en 9 aminoácidos. Por ello se decidió secuenciar tanto estas como el resto de construcciones con un cebador que permitiese leer la secuencia de nucleótidos del fluoróforo mTFP1 completo. Los resultados arrojaron una mutación puntual (V175G) en un aminoácido superficial de la proteína fluorescente en las deleciones 5 y 6, ausente en el resto de construcciones. Ante este resultado, se procedió a secuenciar con el mismo cebador el constructo con los sitios de restricción adicionales del que procedían ambos (M1), viendo que igualmente aparecía esta mutación. Unas medidas preliminares de FRET de dicho constructo “parental” coexpresado con CaM arrojaron unas distancias igualmente anómalas. Se concluyó que en dichas construcciones la sustitución introducida por la PFU polimerasa pudo haber alterado las propiedades de la proteína mTFP1, ya que al tratarse de un aminoácido superficial el afectado, se habría favorecido la interacción entre fluoróforos y la formación de dímeros estables. No obstante, harían falta más ensayos para poder explicar este suceso.

En lo que concierne al resto de constructos, se observa que la reorientación de las hélices A y B mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM deja de producirse en la deleción 1, donde se eliminan 18 aminoácidos cercanos a la hélice B ajenos al sitio de unión a  $\text{PIP}_2$ . Esto es, si bien la deleción de 49 aminoácidos en la región cercana a la hélice A realizada en ensayos previos no afectó a la regulación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM, una deleción adicional de 18 aminoácidos, esta vez en la región cercana a la hélice B en el otro extremo del conector, sí que ha supuesto un impacto negativo en dicho proceso. Se observa que en cuanto se eliminan estos residuos la reorientación deja de producirse. De hecho, a partir de aquí, en ninguna de las deleciones posteriores, en las que se eliminan esta y regiones adicionales (incluida el sitio de unión a  $\text{PIP}_2$ ), se produce un distanciamiento entre fluoróforos de magnitud similar al que tiene lugar con el

conector natural. Estos resultados contradicen a la hipótesis de partida, dado que no parece que el sitio de unión a PIP<sub>2</sub> intervenga en la regulación del canal Kv7.2 por Ca<sup>2+</sup> y CaM, al menos no de manera única. Si esto fuera así se esperaría que el proceso no se viera afectado en la deleción 1, sino a partir de la deleción 3, donde se elimina dicha región. De los datos se puede concluir por tanto que la región del conector próxima a la hélice B tiene un papel importante en la regulación del canal Kv7.2, si bien no permiten descartar una posible implicación de PIP<sub>2</sub>.

De cara a futuros estudios, convendría llevar a cabo un análisis más exhaustivo de esta región, para lo cual se podrían emplear otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR), de cara a analizar las posibles interacciones moleculares de esta región con potenciales ligandos, aunque el gran tamaño de la construcción representa un considerable desafío para la aplicación de esta técnica.

Siendo consciente de las limitaciones de este tipo de estudios, cabe remarcar la importancia que pese a ello tienen, puesto que sirven de base para futuros ensayos que, a buen seguro, permitirán esclarecer la regulación del canal Kv7.2, lo que sin duda será de gran ayuda para tratar sus canalopatías asociadas.

## **5. CONCLUSIÓN**

Las hélices A y B tienen un papel fundamental en la regulación por calcio y calmodulina del canal Kv7.2, puesto que suponen los puntos de anclaje para la asociación de CaM al canal. No obstante, este tipo de estudios demuestran que el conector entre ambas hélices es igual de importante, al servir de bisagra flexible que permite su reorientación la unión Ca<sup>2+</sup>-CaM. Pese a ello, quedan muchas incógnitas por resolver sobre las moléculas que interaccionan con el mismo. Este trabajo supone un punto de partida para despejarlas, pero aún queda mucho camino por recorrer.

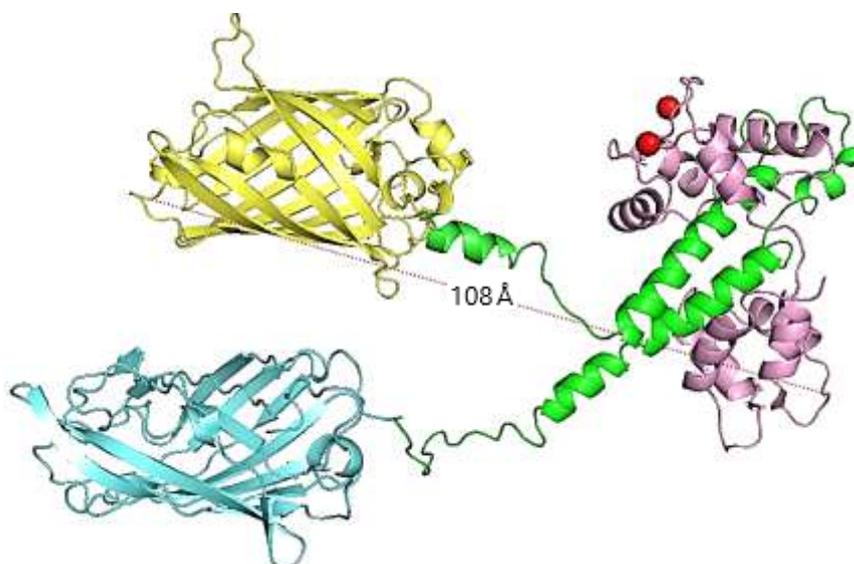
## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Ai, H., Henderson, J. N., Remington, S. J., Campbell, R. E. 2006. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem. J.* 400: 531-540.

- Alaimo, A., Etxeberria, A., Gómez-Posada, J. C., Gomis-Perez, C., Fernández-Orth, J., Malo, C., Villarroel, A. 2018. Lack of correlation between surface expression and currents in epileptogenic ab-calmodulin binding domain kv7.2 potassium channel mutants. *Channels*. 12: 299-310.
- Alaimo, A., Villarroel, A. 2018. Calmodulin: A Multitasking Protein in Kv7.2 Potassium Channel Functions. *Biomolecules*. 8: 57.
- Alberdi, A., Gomis-Perez, C., Bernardo-Seisdedos, G., Alaimo, A., Malo, C., Aldaregia, J., Lopez-Robles, C., Areso, P., Butz, E., Wahl-Schott, C., Villarroel, A. 2015. Uncoupling PIP2-calmodulin regulation of Kv7.2 channels by an assembly destabilizing epileptogenic mutation. *J. Cell. Sci.* 128: 4014-4023.
- Ambrosino, P., Alaimo, A., Bartollino, S., Manocchio, L., De Maria, M., Mosca, I., Gomis-Perez, C., Alberdi, A., Scambia, G., Lesca, G., Villarroel, A., Tagliatela, M., Soldovieri, M. V. 2015. Epilepsy-causing mutations in Kv7.2 C-terminus affect binding and functional modulation by calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1852: 1856-1866.
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z., Chu, J. 2016. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Basel)*. 16: 1-24.
- Bernardo-Seisdedos, G., Nuñez, E., Gomis, C., Malo, C., Villarroel, Á., Millet, O. 2018. Structural basis and energy landscape for the Ca<sup>2+</sup> gating and calmodulation of the Kv7.2 K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: 2395–2400.
- Brown, D. A. 1988. M currents, en: Narahashi, T., (Ed). *Ion Channels*, Springer, Boston, pp. 55-94.
- Etxeberria, A., Aivar, P., Rodriguez-Alfaro, J. A., Alaimo, A., Villacé, P., Gómez-Posada, J. C., Areso, P., Villarroel, A. 2008. Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB J.* 22: 1135-1143.
- Gomis-Perez, C., Alaimo, A., Fernandez-Orth, J., Alberdi, A., Aivar-Mateo, P., Bernardo-Seisdedos, G., Malo, C., Areso, P., Felipe, A., Villarroel, A. 2015. An unconventional calmodulin-anchoring site within the AB module of Kv7.2 channels. *J. Cell Sci.* 128: 3155-3163.
- Hernandez, C. C., Zaika, O., Shapiro, M. S. 2008. A Carboxy-terminal Inter-Helix

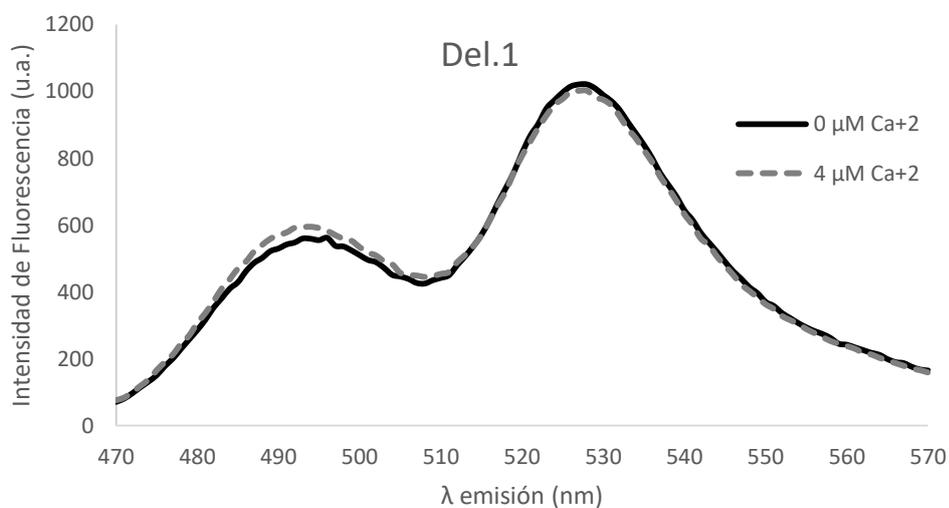
- Linker As the Site of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Action on Kv7 (M-type) K<sup>+</sup> Channels. *J. Gen. Physiol.*, 132: 361-381.
- Kremers, G. J., Goedhart, J., van Munster, E. B., Gadella, T. W. J. J. 2006. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry*. 45: 6570-6580.
- Marrion, N. V. 1997. Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 483-504.
- Nakajo, K., Kubo, Y. 2008. Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks. *J. Physiol. (Lond.)*. 586: 2827-2840.
- Piston, D. W., Kremers, G. J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32: 407-414.
- Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T. J., Saftig, P., Friedrich, T. 2006. Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> channel assembly. *J. Neurosci.* 26: 3757-3766.
- Suh, B.-C., Inoue, T., Meyer, T., Hille, B. 2006. Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gate KCNQ ion channels. *Science*. 314: 1454-1457.
- Vogel, S. S., van der Meer, B. W., Blank, P. S. 2014. Estimating the distance separating fluorescent protein FRET pairs. *Methods*. 66:131-138.
- Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., Villarroel, A. 2002. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J. Biol. Chem.* 277: 28545-28553.
- Zaydman, M. A., Cui, J. 2014. PIP<sub>2</sub> regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. *Front Physiol.* 5: 195.
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M. B., Jin, T., Logothetis, D. E. 2003. PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*. 37: 963-975.

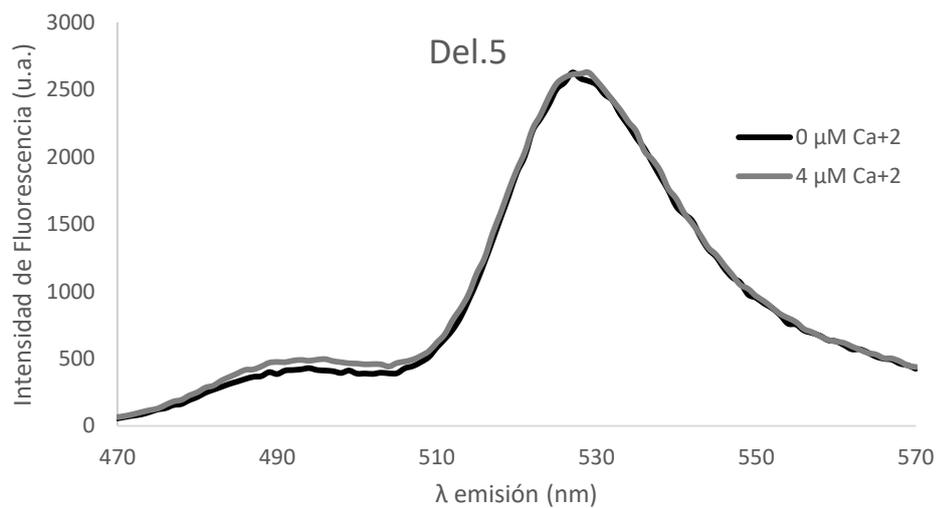
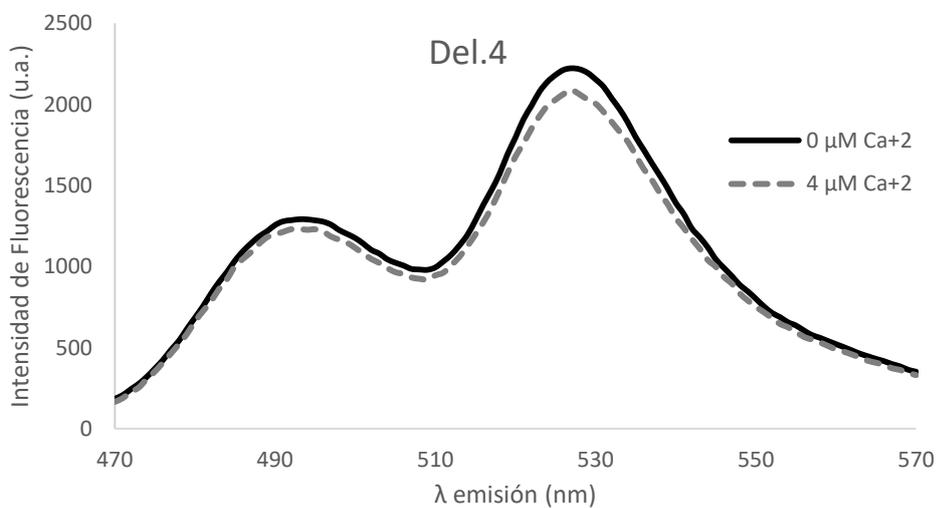
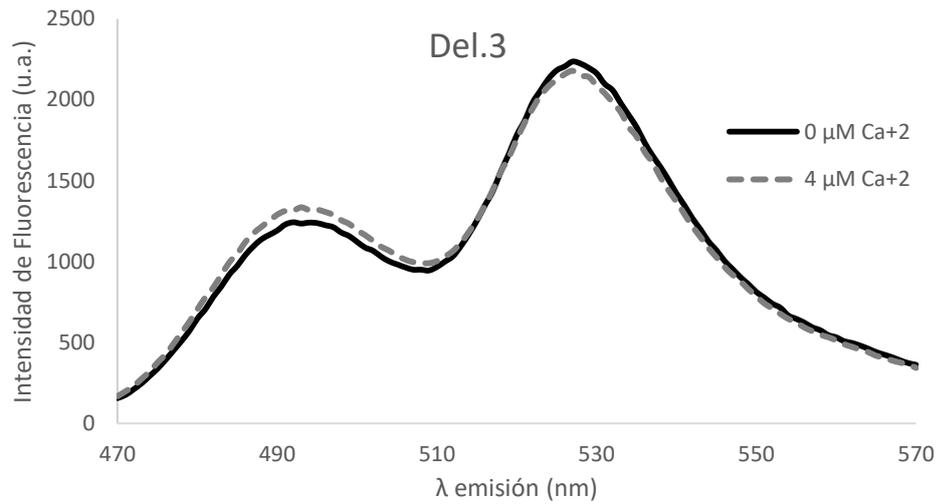
## ANEXO 1. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO CAM/KV7.2 CON MTFP y VENUS

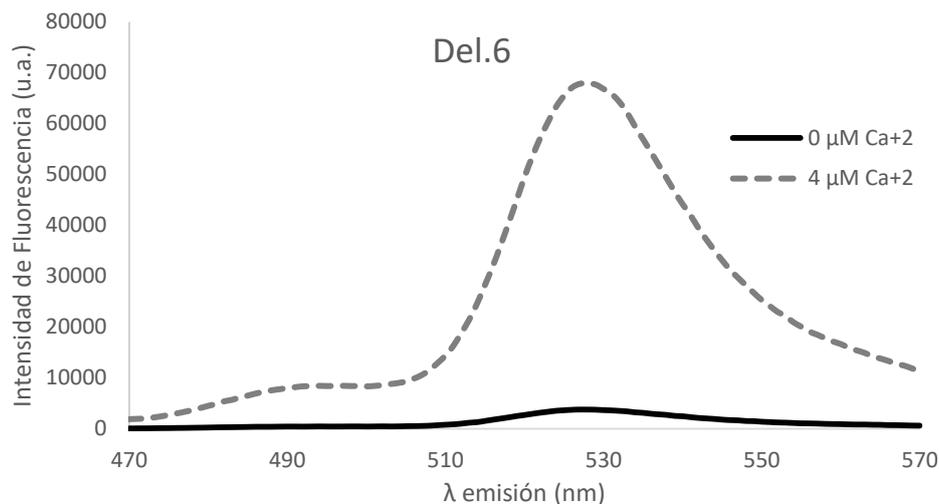


**Figura 8. Representación estructural del complejo CaM/Kv7.2 (conector y hélices A, B y C) con los fluoróforos mTFP y Venus en los extremos N y C terminales.** En amarillo se indica Venus, en azul mTFP, en verde el conector y las hélices A, B y C, en púrpura CaM y en rojo los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . La orientación de ambos fluoróforos es tan sólo una de las muchas posibles. La distancia entre dos extremos del complejo se sitúa un poco por encima de los 100 Å (10 nm). La figura se realizó con PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC) a partir de las estructuras publicadas de CaM/Kv7.2 (PDB: 6FEG), mTFP (PDB: 4Q9W) y Venus (PDB: 1MYW).

## ANEXO 2. ESPECTROS DE EMISIÓN POR FRET

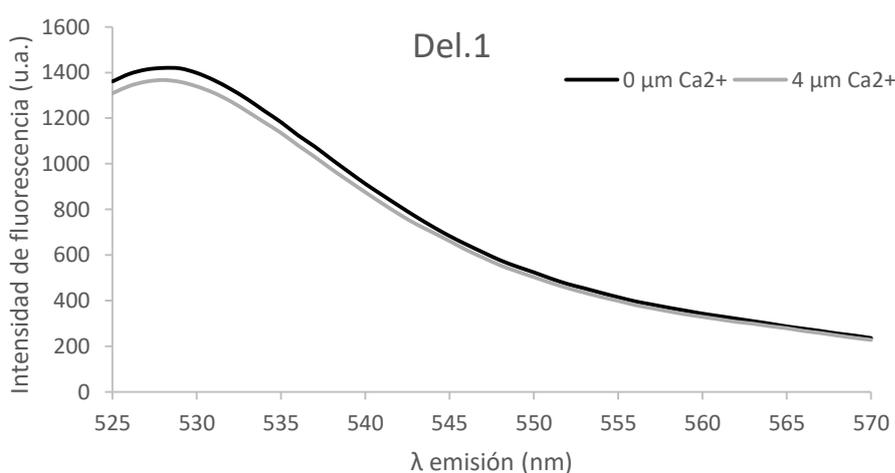


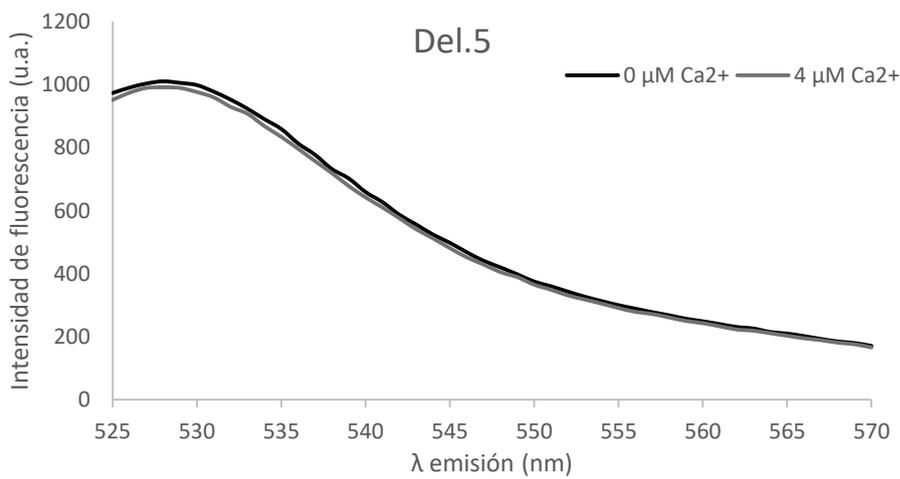
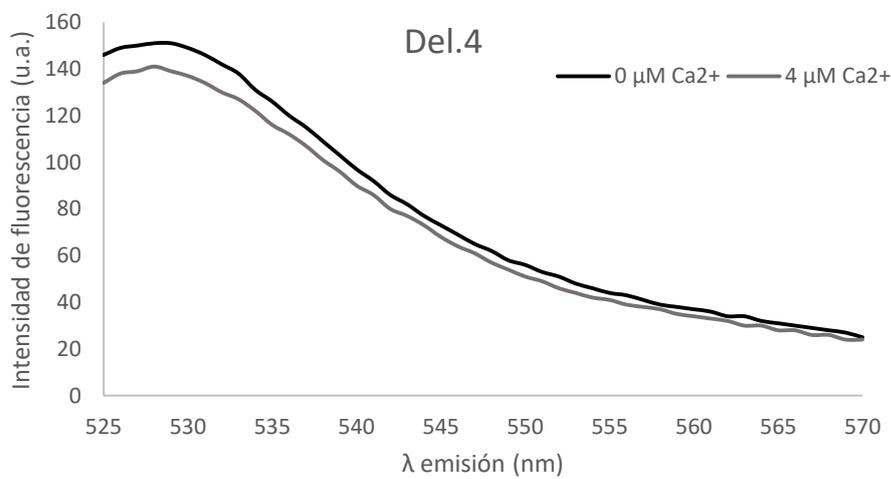
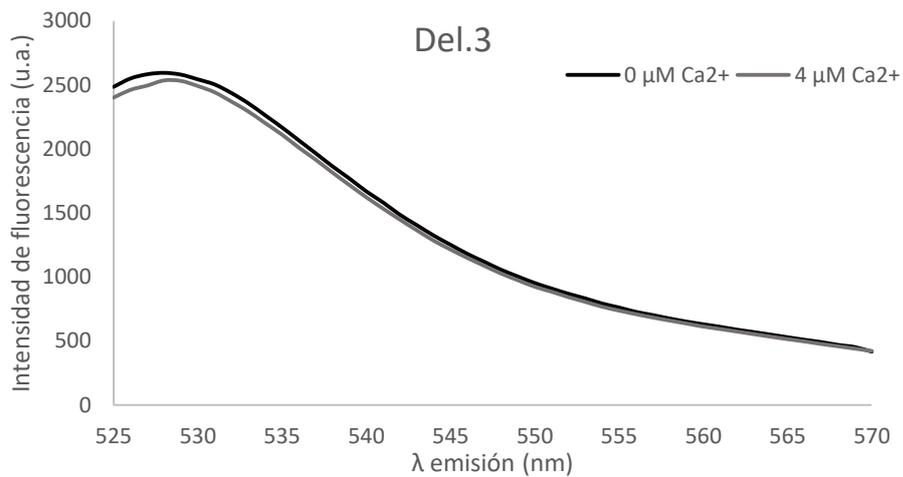


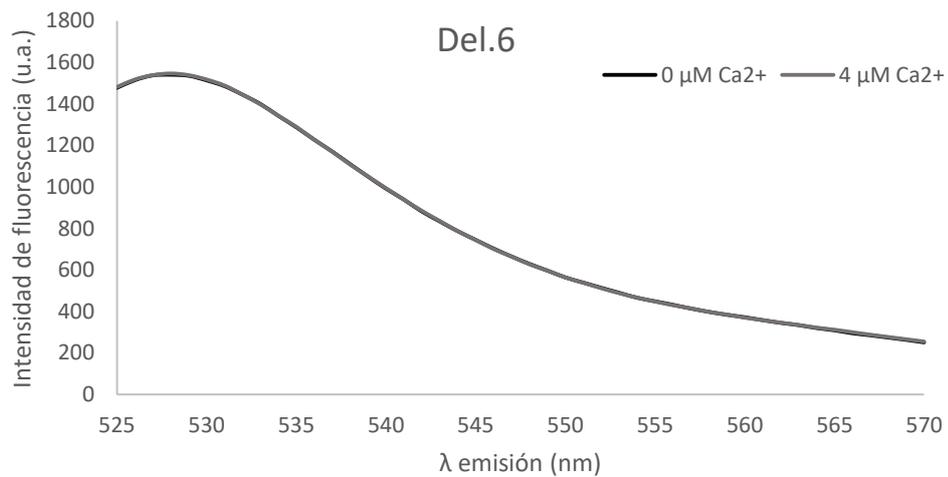


**Figura 9. Espectros de emisión entre 470 y 570 nm ante una excitación puntual de mTFP1 a 488 nm.** No se incluye el espectro de la deleción 2 porque no se pudo llevar a cabo su purificación y las medidas de fluorescencia. Se producen anomalías en tres muestras. En Del.4 se espera una mayor intensidad de emisión de mTFP1 y una menor intensidad de emisión de mcpVenus173 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , si bien esto no ocurre. No obstante, el ratio de FRET sí que disminuye, por lo que sí que hay un distanciamiento entre fluoróforos. Parece que se produce una caída de señal que podría haber conducido a una malinterpretación de los datos. En Del.5. el ratio de FRET es demasiado elevado, y su motivo reside en la mutación V175G comentada con anterioridad. Pese a ello, se observa un descenso en el ratio, sinónimo de un pequeño distanciamiento. En Del.6 de nuevo se repite esta circunstancia, y si bien hay un descenso del ratio de FRET al añadir calcio, lo cual se traduce en un distanciamiento, la intensidad de esta segunda medida contrasta notablemente con la medida en ausencia de calcio. Se desconoce el motivo de este cambio; probablemente su causa sea un error experimental.

### ANEXO 3. ESPECTROS DE EMISIÓN DE VENUS







**Figura 10. Espectros de emisión entre 525 y 570 nm ante una excitación puntual de mcpVenus173 a 515 nm.** Estas medidas se muestran como prueba de que los experimentos se llevaron a cabo correctamente y no se produjo una caída notoria de la señal de mcpVenus173 a causa de los cambios en el pH, lo que hubiera conducido a un menor ratio de FRET y a una interpretación errónea de un distanciamiento entre fluoróforos.