



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ESTUDIO DE LA HETERODIMERIZACIÓN DE CANALES K<sub>2</sub>P MEDIANTE LA  
COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (*BiFC*)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: LORENA ARAYA ROJAS

PROFESOR GUIA: DR.LEANDRO ZUÑIGA

TALCA-CHILE

2019

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## INDICE

	Página
1. RESÚMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEORICO.....	4
4. OBJETIVOS.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6. RESULTADOS.....	21
7. DISCUSIÓN.....	27
8. CONCLUSIONES.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA.....	32

## RESUMEN

La complementación bimolecular fluorescente (*BiFC*) es una técnica de biología molecular utilizada en investigación para visualizar interacciones entre proteínas o la interacción proteína-macromolécula, basándose en el revelado de un complejo fluorescente. Este proyecto busca validar esta técnica como un método para determinar la existencia de heterodímeros, específicamente de la familia K2P; pudiendo homologarse a otros grupos de canales: Además de entregar herramientas que permitirían dilucidar la conformación espacial de los canales K2P.

Se ha reportado la existencia de heterodímeros funcionales entre canales de la familia K2P, siendo un ejemplo de esta arquitectura el canal heterodimérico formado por TASK-1 y TASK-3; de esta manera utilizando estos canales en conjunto a otros pertenecientes a esta misma familia, podría llegar a postularse si es *BiFC* una técnica que permita verificar la heterodimerización de manera rápida y sencilla.

Se propone la generación de constructos de los canales TWIK-1, TASK-1, TASK-3 y TALK-1 que contengan un fragmento de la proteína luminiscente GFP (VN173 o VC155). Una vez generados estos constructos, se realizará una cotransfección de estos, pudiendo observarse la formación de los heterodímeros ante la presencia de fluorescencia, de lo contrario la ausencia de heterodimerización.

## INTRODUCCIÓN

Los canales de potasio, son un amplio grupo de canales iónicos que se dividen en tres grandes familias según sus dominios transmembrana; los canales Kv que presentan seis dominios transmembrana y un poro, los canales Kir que presentan dos dominios transmembrana y un poro, y finalmente, los canales K2P que presentan cuatro dominios transmembrana y dos dominios formadores de poro por subunidad.

Los canales K2P a diferencia de los canales Kv y Kir, son capaces de existir como homodímeros o heterodímeros, sin embargo no se ha reportado la existencia o no de heterodímeros para todos los canales pertenecientes a esta familia.

Por otro lado, los canales K2P pueden presentar la conformación *swapped* donde existe un intercambio en las subunidades a extremos opuestos del canal, quedando alejados los extremos amino y carboxilo; o la conformación *non swapped*, en la cual los extremos amino y carboxilo se encuentran próximos entre sí.

La complementación bimolecular fluorescente (*BiFC*) al ser una técnica de biología molecular basada en el revelado de un complejo luminiscente, formado a partir de dos fragmentos próximos entre sí de una proteína fluorescente, permite evaluar la interacción entre proteínas uniendo los fragmentos a los extremo amino y carboxilo. Por lo tanto, Si existe formación de heterodímeros entre los canales K2P, la complementación bimolecular fluorescente evaluará la formación a partir de la producción de luminiscencia. Siendo de esta manera, *BiFC* una buena técnica para evaluar estructuras heterodiméricas de membrana, sirviendo como una técnica de *screening*.

## MARCO TEÓRICO

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de iones desde del interior al exterior de la membrana celular o viceversa, a una velocidad superior a otro tipo de transporte. Entre los distintos grupos de canales iónicos, nos encontramos con los canales de potasio ( $K^+$ ).

“Los canales de  $K^+$  son los más ubicuos y diversos. Existen desde la membrana celular de los organismos tan ancestrales como las arqueobacterias hasta las neuronas del humano”<sup>[1]</sup>. He aquí la relevancia de comprender su estructura y funcionamiento; ya que no sólo juegan un papel importante en el transporte celular, “Los canales de potasio participan en muchas funciones biológicas, desde la homeostasis iónica hasta la generación y modulación del potencial de membrana eléctrica”.<sup>[2]</sup>, también se ha visto implicancias en distintas patologías y comportamientos de interés en farmacología.

“La diversidad molecular confiere a los canales de potasio diferencias en sus cinéticas, en su sensibilidad al voltaje y en sus respuestas a distintas toxinas y fármacos. Sin embargo, todos los canales de  $K^+$  son similares en su estructura y como firma distintiva todos tienen la secuencia de aminoácidos glicina, tirosina y glicina (G,Y,G) en su filtro de selectividad”<sup>[1]</sup>. A pesar de estas similitudes, también existen diferencias estructurales entre los distintos grupos de canales de potasio; es por esto que se subdividen en familias.

“Los criterios estructurales y funcionales han conducido a la clasificación de tres familias principales: los regulados por voltaje (KV), rectificación interna (Kir) y los canales de potasio de dominio de dos poros (K2P)”<sup>[3]</sup>.

Los canales KV, presentan un dominio formador de poro y seis dominios transmembrana, los canales Kir presentan un solo poro y dos dominios transmembrana; mientras que los canales K2P, como bien lo menciona la clasificación anterior, presentan dos dominios formadores de poro, además de cuatro dominios transmembrana.

“Los canales K2P funcionales se ensamblan como dímeros, en contraste con todos los otros canales K<sup>+</sup>, que son tetrámeros. Cada subunidad tiene cuatro dominios transmembrana (M1-M4), dominios de dos poros (P1 y P2) y dos hélices de tapa (*cap*) extracelular (C1 y C2)”.<sup>[4]</sup>, (Figura 1).

Entre las características estructurales de los canales K2P aplicables a todos representantes, se puede mencionar que “*cap* se extiende ~35 Å por encima de la membrana extracelular y cubre un vestíbulo extracelular que tiene dos portales laterales para iones K<sup>+</sup>. Las hélices que recubren los poros, M2 y M4, corren oblicuamente a través de la membrana celular, mientras que las hélices exteriores, M1 y M3, están más orientadas verticalmente”<sup>[5]</sup> como bien se puede ilustrar en la figura 1.

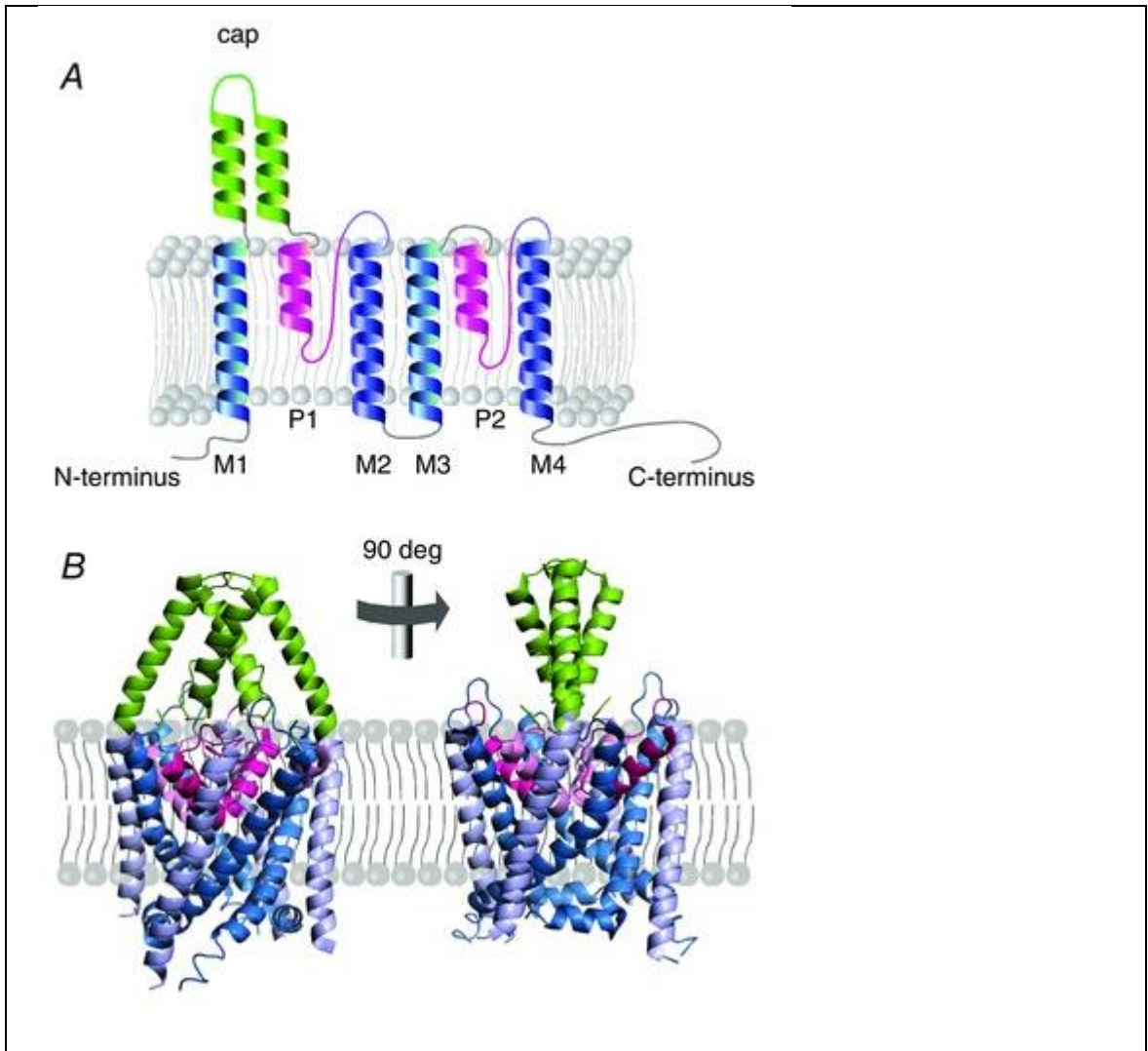


Figura 1: Organización estructural de canales K2P<sup>[2]</sup>

En la figura A, se observa la representación esquemática de la organización de subunidades K2P, con los dos dominios de poros (en rosa), los cuatro dominios transmembrana (en azul) y el *cap* extracelular (en verde). En B, una reconstrucción tridimensional del canal TWIK-1 deducida de la estructura cristalina (Miller & Long, 2012; código de identidad del Protein Data Bank 3UKM). En donde los diferentes dominios se representan con el mismo código de color que en A.



Los canales pertenecientes a la familia K2P también se dividen en subfamilias, tal como se observa en la Figura 2; los canales se agrupan en seis subgrupos con distintas características, que le confieren a cada una de estas subfamilias, propiedades únicas y distinguibles.

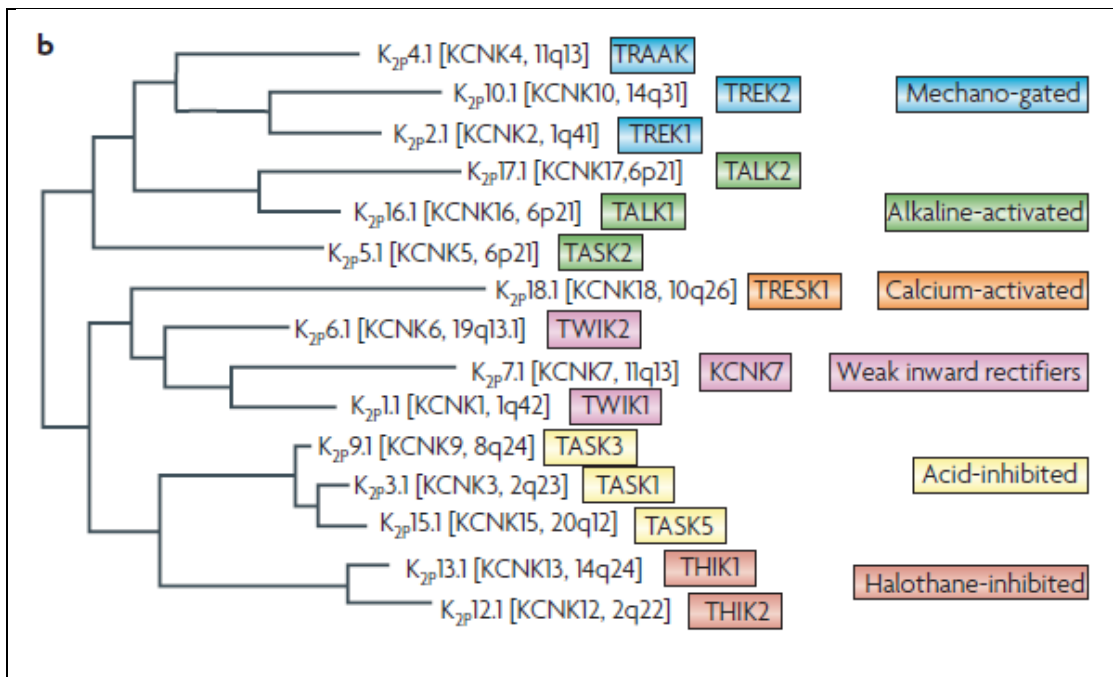


Figura 2: Árbol filogenético de los canales K2P<sup>[5]</sup>

De derecha a izquierda se observan la su nomenclatura, localización cromosómica, nombre convencional y las características funcionales de cada subfamilia de canales de la familia K2P, los cuales se diferencian entre sí por distintos colores.

Como se mencionó anteriormente, los canales K2P son capaces de existir como dímeros, reportándose homodímeros para cada uno de los canales, sin embargo, “Se han proporcionado pruebas de heteromultimerización para TASK1 y TASK3”<sup>[5]</sup>

Es la existencia de estos Heterodímeros de canales K2P los que abren nuevos horizontes de investigación; ya sea al dilucidar si existe algún tipo de preferencia conformacional entre la conformación *swapped* o *non swapped*, o bien, evaluar en etapas posteriores la presencia de una o más características específicas de cada grupo de subfamilias, en caso de existir heterodímeros en los canales estudiados.

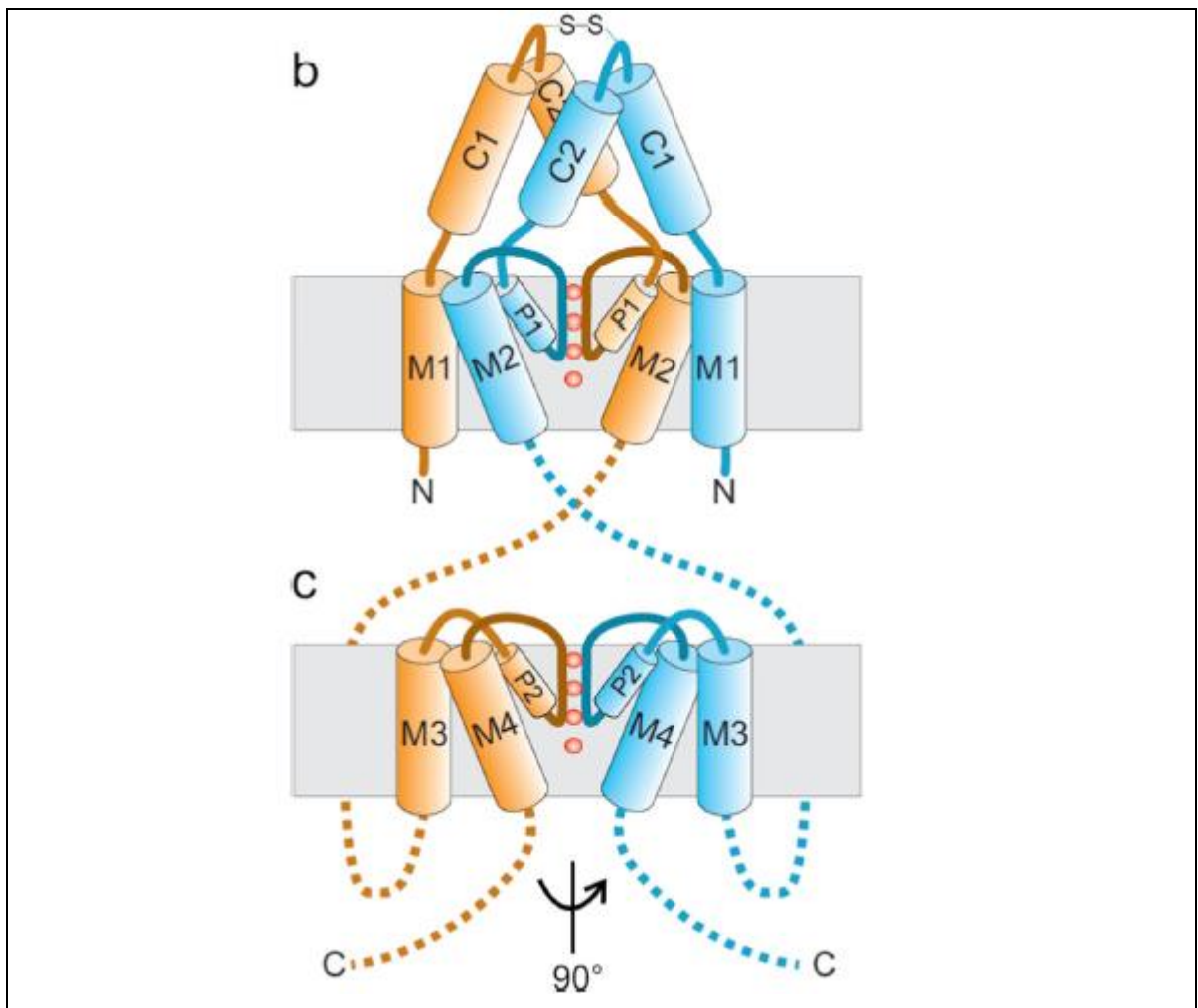


Figura 3: La estructura de los canales K2P. Una topología de los canales K2P <sup>[4]</sup>

En la figura B, se observa un esquema de la estructura de la parte N-terminal de las dos subunidades (incluidos los dominios M1, C1, C2, P1 y M2). En la figura C, se observa un esquema de la estructura C-terminal de las dos subunidades (incluidos los dominios M3, P2 y M4).

“Desde que las estructuras de TREK-1 y TREK-2, las cuales fueron registradas en la base de datos de PDB por Carpenter y colaboradores, también muestran dominios *swapped* (códigos de PDB 4TWK y 4BW5), es probable que este sea el modelo generalmente aplicable para los canales K2P”<sup>[4]</sup>, sin embargo, eso no descarta la existencia de la conformación *non swapped* en los canales K2P. Es por esto, que las investigaciones en torno a la conformación espacial de este grupo de canales se siguen estudiando.

La conformación *swapped* es aquella en la que existe un intercambio en las subunidades a extremos opuestos del canal, quedando alejados los extremos amino y carboxilo; y la conformación *non swapped*, aquella en la cual los extremos amino y carboxilo se encuentran próximos entre sí. En la Figura 3B, se puede observar la conformación *swapped*, en la cual se puede apreciar los dominios de poro del canal, distribuidos de manera opuesta. Mientras que en la Figura 3C “Se puede ver que, en este caso, la hélice interna y externa de la misma subunidad son adyacentes. Las dos hélices de poro opuesto y los bucles de poro forman la otra mitad del filtro de selectividad. Las hélices M2 y M3 están conectadas por líneas de puntos para ilustrar la disposición espacial general de las cuatro hélices transmembrana de cada subunidad”<sup>[4]</sup>.

Ya sea en el caso específico de las conformaciones de los canales K2P o en otro grupo de canales “Las interacciones de proteínas son un mecanismo fundamental para la generación de especificidad reguladora biológica. El estudio de las interacciones de proteínas en células vivas es de particular importancia porque las interacciones que ocurren en una célula particular dependen del complemento completo de proteínas presentes en la célula y de los estímulos externos que influyen en la célula”<sup>[6]</sup>.

Es por lo anteriormente mencionado que las interacciones entre la conformación *swapped* y *non swapped* junto con la determinación de la presencia de heterodímeros de canales K2P, será observada a partir de complementación bimolecular fluorescente o *BiFC* que permite la detección o ausencia de interacción proteína-proteína (*PPI*) en células vivas. Esta técnica fue documentado cuando “En 2002 Hu et al. estableció un sistema de análisis de proteínas complementario basado en la proteína YFP después de una investigación meticulosa y lo llamó *BiFC* ”.<sup>[7]</sup>

“Para verificar estos *PPI* identificados a partir de estudios de genoma, numerosos métodos, incluido el ensayo de dos híbridos de levadura canónica, el ensayo de extracción *in vitro*, el ensayo de inmunoprecipitación in vivo, el ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (*FRET*), el ensayo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (*BRET*), y el ensayo de complementación bimolecular fluorescente (*BiFC*), se han utilizado. Entre estos métodos, el ensayo *BiFC* basado en proteínas fluorescentes se ha aceptado ampliamente en la última década”<sup>[8]</sup>, Ya sea por la particularidad de analizar células vivas , su simplicidad o su costo menor, *BiFC* ha empezado a cobrar mayor popularidad, estudiándose sus limitaciones, ventajas y posibles avances.

“El ensayo *BiFC* se basa en la complementación estructural entre dos fragmentos N-terminales y C-terminales no fluorescentes de una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (*GFP*), consisten en 11 cadenas  $\beta$  antiparalelas que forman un barril  $\beta$ , con una hélice  $\alpha$  en el interior y varias estructuras helicoidales cortas”<sup>[9]</sup>. Es así, como la interacción entre estas proteínas con capacidad fluorescente forman complejos fluorescentes irreversibles que permiten censar interacciones entre proteínas o macromoléculas en estudio.

En el caso específico de la proteína fluorescente *GFP*, los fragmentos de GFP (NGFP y CGFP) se dividen y se asocian para volver a la formar *GFP* produciendo una interacción fuerte con el extremo C-terminal y N-terminal de la proteína, recuperando el plegamiento y fluorescencia. En caso de no formarse la interacción ya sea por distancia entre los fragmentos o porque las proteínas en estudio no se ensamblan, no se formara GFP impidiendo la emisión de fluorescencia y por lo tanto, una observación negativa ante este fenómeno.

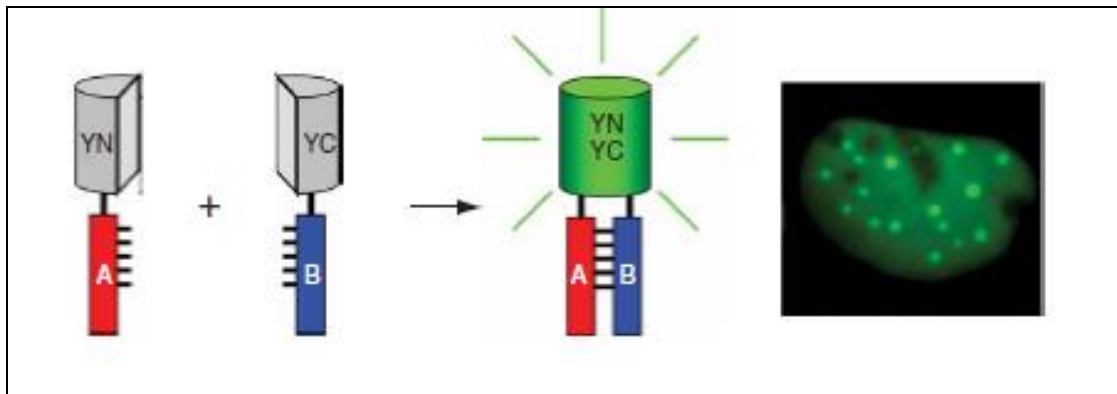


Figura 4: Diagrama esquemático que representa el principio del ensayo BiFC<sup>[10]</sup>

Los fragmentos (YN y YC) de la proteína fluorescente amarilla (*YFP*) se fusionan con dos parejas de interacción (A y B). Una interacción entre las proteínas facilita la asociación entre los fragmentos para producir un complejo bimolecular fluorescente. La imagen de la derecha muestra el análisis de *BiFC* del reclutamiento de una proteína a focos subnucleares mediante dimerización con una versión mutada. Imagen de la derecha adquirida por Nirmala Rajaram, reproducida con permiso de la Sociedad Americana de Microbiología.

En la Figura 4, se puede observar el mecanismo de la técnica y los resultados esperables al encontrarse ante un resultado positivo, en donde la interacción entre las proteínas de

interés es favorable observándose la fluorescencia característica de la proteína fluorescente en uso; en caso contrario no se censaría fluorescencia.

“La ventaja del enfoque de BiFC en comparación con otros métodos de complementación es que el complejo ensamblado tiene una fuerte fluorescencia intrínseca que permite la visualización directa de la interacción de la proteína. Por lo tanto, la interacción puede detectarse sin agentes fluorógenos o cromogénicos exógenos, evitando la posible perturbación de las células por estos agentes”<sup>[6]</sup> Además de eso, “Varias características del ensayo BiFC lo hacen valioso para muchos estudios de interacciones de proteínas. Primero, permite la visualización directa de las interacciones de proteínas y no depende de la detección de efectos secundarios. En segundo lugar, las interacciones pueden visualizarse en células vivas, eliminando artefactos potenciales asociados con la lisis o fijación celular. En tercer lugar, las proteínas se expresan en su contexto celular normal, idealmente a niveles comparables a sus homólogos endógenos. Por lo tanto, se prevé que reflejen las propiedades de las proteínas nativas correspondientes, incluidos los efectos de cualquier modificación posterior a la traducción”.<sup>[6]</sup> Haciendo de este ensayo, una herramienta valiosa a la hora de estudiar interacciones de esta naturaleza.

## OBJETIVOS

Objetivo general: determinar la existencia de heterodímeros funcionales entre los canales TWIK-1, TASK-1, TASK-3 y TALK-1 validados por la técnica de complementación biomolecular fluorescente.

Los objetivos específicos son:

- 1) Generar constructos de los canales K<sup>2</sup>P en estudio con fragmentos de la proteína luminiscente GFP
- 2) Realizar una cotransfección transitoria de los constructos generados
- 3) Evaluar la presencia de heterodimerización de los canales por medio fluorescencia

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1) Biología molecular

#### 1.1 Mutagénesis sitio-dirigida

Se realizó una PCR de los fragmentos que conforman la proteína luminiscente GFP (VN173 y VC155) con los partidores CMV-F y VN173rev para el fragmento VN173, BSRGI<sub>sen</sub> y XbaI<sub>rev</sub> para el fragmento VC155.

Para los canales utilizados, se realizó una PCR utilizando una concentración de 20 ng/μl de cada uno. Mientras que para los fragmentos de la proteína GFP, se utilizó una concentración de 20 ng/μl para cada uno de los fragmentos VN173 y VC155.

Se utilizó Taq DNA polimerasa, recombinante de la marca Thermo Fisher Scientific y se siguió el protocolo del kit. En un volumen final de 50μl, existe una concentración de 0,2μM de cada uno de los partidores, 2,5mM de Magnesio, 20ng/μl de DNA, 0,25 U/μl de Taq polimerasa y 2mM de DNTPs.

Se realizaron 25 ciclos. El primer paso de denaturación se llevó a cabo a 95°C durante 5 minutos, la segunda denaturación se realizó a 95°C durante 15 segundos, el *annealing* a 60°C durante 35 segundos, la extensión a 72°C durante 1 minuto y la extensión final a 72°C durante 5 minutos.



Una vez terminada la reacción de PCR, el producto de la amplificación se visualizó a través de un gel de agarosa según la sección 1.6, para la etapa posterior de purificación se utilizó un transiluminador para su visualización de las bandas de interés; las cuales fueron recortadas, luego se procedió a purificar según la sección 1.2, digerir según la sección 1.6 y posteriormente ligar.

### 1.2 Purificación de DNA extraído de gel de agarosa

Para la purificación del DNA de interés observado en los geles de agarosa, se recortó con un bisturí estéril la banda de DNA de interés y se utilizó el kit E.Z.N.A gel extraction de la marca OMEGA bio-tek, en donde se utilizó el protocolo provisto en la guía rápida.

### 1.3 Ligación de los Fragmentos de DNA

Para realizar la ligación del DNA purificado, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de la marca Thermo Fisher Scientific, en la que se siguió el protocolo sugerido por el kit. Se utilizó un volumen de 1µl de buffer T4 10x, 1µl de la enzima T4 DNA ligasa, 3µl del fragmento VC o VN según el constructo a realizar, 2,5µl de DNA del canal de interés, y 2,5 µl del vector perteneciente al canal TALK2, en un volumen final de 10µl. Para el control negativo se utilizó un volumen de 5,5µl de agua, 2,5µl de vector, 1µl de la enzima T4 DNA ligasa y 1µl de buffer T4 10x. La mezcla se dejó a 22°C por 10 minutos para posteriormente ser usada para transformar las células competentes DH5α.

#### 1.4 Transformación de células competentes DH5 $\alpha$

Se utilizó el método de shock térmico para transformar las células DH5 $\alpha$ , con los constructos generados en las anteriores etapas, utilizando placas de agar LB (Medio luria Broth , el cual contiene en cada 1000ml , 10 g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio) con ampicilina para este fin.

Se utilizó el volumen de 100 $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  conservadas a -80°C, las cuales fueron descongeladas a 4°C, una vez listas, se mezclaron las células junto a cada uno de los constructos generados previamente mantenidos a 4°C; la mezcla de las células con los plásmidos se mantuvo durante 30 minutos en hielo y luego se procedió a aplicar shock térmico al someter la mezcla a 42°C por un minuto e inmediatamente exponer al hielo por dos minutos. Una vez terminado el shock térmico, se agregó 250 $\mu$ l de LB a cada tubo y se dejó agitar por 1 hora a 37°C. Finalmente, se sembró en césped las placas de Agar LB con ampicilina y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. En estas placas solo crecieron las bacterias que incorporaron el gen de resistencia a ampicilina.

#### 1.5 Purificación de DNA plasmidial

Se escogieron colonias de las placas incubadas, suspendiéndolas en 20 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu$ g/ml, utilizando tubos falcon de 50 ml, los cuales fueron incubados durante 24 horas a 37°C en agitación constante.

Los tubos incubados, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Para la purificación del DNA plasmidial se utilizó el kit comercial GeneJET Plasmid Midiprep kit.

#### 1.6 Digestión con las enzimas de Restricción HindIII, XbaI y BSRGI

Para formar el constructo de interés (VC-Canal o bien, VN-Canal), los fragmentos de la proteína luminiscente GFP y el DNA de los canales, deben presentar las mismas enzimas, manteniéndose el así el mismo marco de lectura.

Es necesario digerir tanto el plásmido como el producto de PCR a insertar para generar los extremos complementarios que se unirán durante la ligación; las enzimas utilizadas para este propósito fueron HindIII , BSRGI y XbaI.

De esta manera se utilizaron tubos con 13µl de DNA del fragmento VN o Canal de interes, 3,5µl de agua, 2µl de buffer tango, 1µl de HindIII y 0,5µl de BSRGI. Para el DNA del fragmento VC, se agregaron 13µl del fragmento VC o canal de interés, 4µl de agua, 0,5µl de HindIII y 0,5µl de XbaI. Los tubos se dejaron a 37°C durante 1 hora con 41 minutos. Una vez finalizada la digestión de los Fragmentos, se procedió a ligar los fragmentos VC y VN con cada uno de los canales según la sección 1.3 y transformar según la sección 1.5, además de verificar la formación del constructo a partir de la observación de gel de agarosa según la sección 1,7.

Para verificar que nos encontramos con los constructos de interés, se utilizaron las enzimas HindIII y BSRGI para los plásmidos que contenían el fragmento VN y las enzimas BSRGI y XbaI para los plásmidos que contenían el fragmento VC de la proteína GFP. Las enzimas utilizadas pertenecían a la marca Thermo Fisher Scientific

Para esto se utilizaron tubos con 5  $\mu$ l del DNA plasmidial purificado del constructo unido al fragmento VN , 2 $\mu$ l de buffer tango, 1  $\mu$ l de HindIII , 0,5  $\mu$ l de BSRGI y 11,5 $\mu$ l de agua. Para los canales con el fragmento VC de GFP se utilizó 5  $\mu$ l del DNA plasmidial purificado del constructo, 2  $\mu$ l de buffer tango, 0,5 $\mu$ l de BSRGI, 0,5 $\mu$ l de XbaI y 12 $\mu$ l de agua. Los tubos se dejaron actuar durante 1 hora a 37°C.

### 1.7) Electroforesis en Gel de Agarosa

Para visualizar los fragmentos esperados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando buffer TAE (Tris, acetato , EDTA) al 1%, tiñéndose el gel con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó ladder de 1kb y buffer de corrida. El gel fue sometido a una corriente de 100 volt por un periodo de 30 minutos. La observación de las bandas fue posible por medio del sistema de documentación en gel ENDURO™ GDS de Labnet.

### 2) Cotransfección de los constructos

Para la cotransfección se utilizaron células HEK-293, previamente conservadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fisiológico bovino y un 1% de ampicilina/estreptomicina.

El día previo a la cotransfección, se separó desde un cultivo de células HEK-293, las células a utilizar; para lo cual se debió despegar estas células desde la placa madre y posteriormente dividir las en el número de placas para las cotransfecciones a realizar. Para

llevar a cabo el proceso, se requirió de 3 lavados con PBS (tampón fosfato salino que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio) a una concentración de 1x, posteriormente, se tripsinizó durante un segundo y se dio suaves golpes a la placa madre, observándose una coloración blanquecina cuando las células ya se encontraron desprendidas. Inmediatamente después, se detuvo la tripsinización agregando el medio DMEM/F12; luego de finalizar el paso anteriormente descrito, se procedió a pipetear varias veces, produciendo disgregación mecánica. Finalmente se separaron y dispusieron las células HEK-293 en las nuevas placas.

Antes de realizar la cotransfección en el día programado, se procedió a observar la confluencia de las placas, siendo óptimas entre un 60% al 90%. Cumpliéndose este estándar, se ejecutó la transfección utilizando el kit comercial TurboFect™ Transfection Reagent, siguiendo el protocolo B del kit. Las concentraciones de DNA utilizado, fue de 1µg, el cual se dividió en 500ng del constructo con el fragmento VN y 500 ng del constructo con el fragmento VC.

Una vez finalizado el proceso de cotransfección, las placas se incubaron 24 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3) Evaluación de Fluorescencia

La evaluación de los constructos a través de la observación de fluorescencia en las placas con células HEK-293 anteriormente transfectadas, se llevó a cabo finalizado el punto 1.8. Para ello, se dispuso de las placas de interés, las cuales fueron observadas en un microscopio de fluorescencia de la marca OLYMPUS utilizando un filtro azul.

Las fotografías, de los productos de fluorescencia observados, se llevaron a cabo a partir de una cámara fotográfica de teléfono celular convencional.

## RESULTADOS

### 1) Constructos de canales K2P

Como bien se puede observar en las Figuras 5, 6 y 7 de la sección de resultados, se logró amplificar los fragmentos de la proteína fluorescente GFP, la cual presento las bandas de 250 pb para VC y 715 pb para VN en todas las electroforesis.

En la Figura 5, se muestra el producto de amplificación de PCR del DNA de GFP que posteriormente se purifico y ligo con el gen letal PJECT; la transformación mostro resultados positivos como bien se muestra en la Figura 6 al encontrarse las bandas anteriormente mencionadas. Por otro lado, las digestiones de los fragmentos como bien se muestra en la Figura 7, permitieron la inserción de las enzimas de restricción, las que posteriormente se utilizaron para digerir los canales y constructos, manteniéndose así, el marco de lectura.

En la Figura 8, se observa el resultado de uno de los tantos ensayos de amplificación del DNA de los canales estudiados, observándose resultados positivos en A para TALK-1, con su posterior digestión en B. Estos ensayos se realizaron para todos los canales en estudio, proporcionando el paso anterior a su ligación a sus correspondientes fragmentos de GFP.

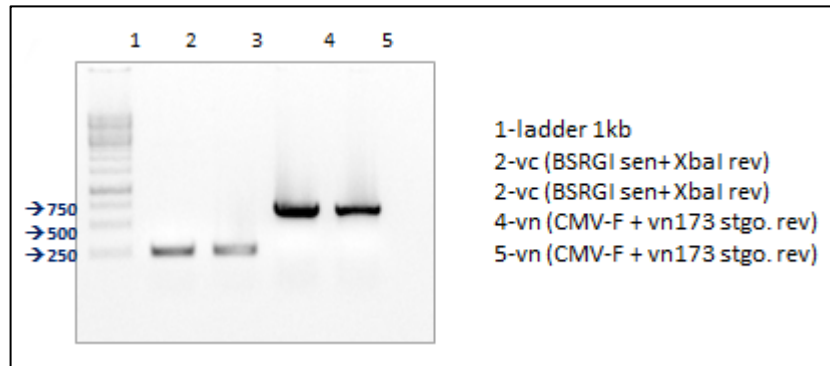


Figura 5: Producto de amplificación por medio de PCR

*Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En él se puede observar el DNA de proteína GFP con sus fragmentos VN173 y VC155, los cuales presentaron las bandas esperadas, 250 pares de bases (pb) para VC (carril 2 y 3) y 715 pares de bases para VN (carril 4 y 5). En el carril 1, se observa el marcador de peso molecular de 1kb.*

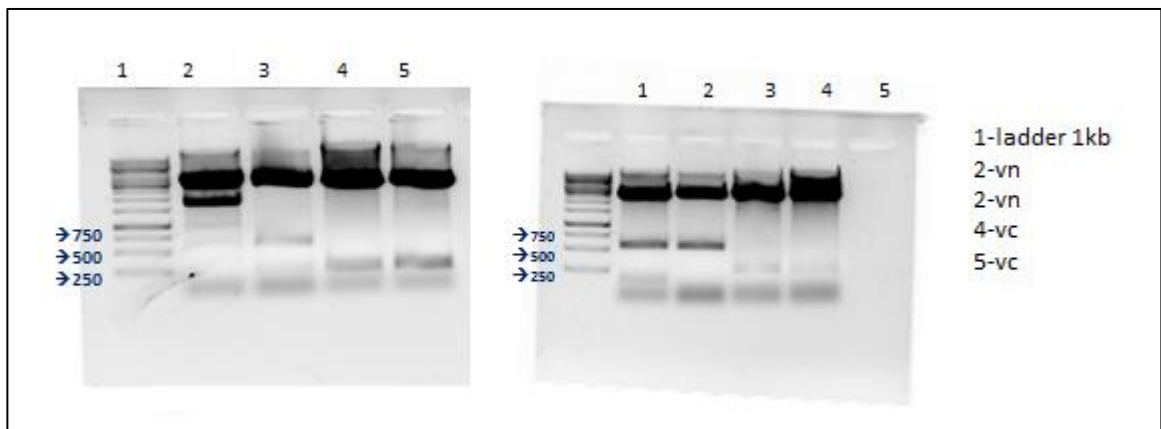


Figura 6: Producto de Transformación de VN173 y VC 155 previa ligación con PJECT

*Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En él se puede observar el DNA de los fragmentos VN173 y VC155 de la proteína fluorescente GFP, los cuales presentaron las bandas esperadas, 715 pb para VN (carril 2 y 3) y 250 pb para VC (carril 4 y 5) en ambos gels. En el carril 1, se observa el marcador de peso molecular de 1kb.*



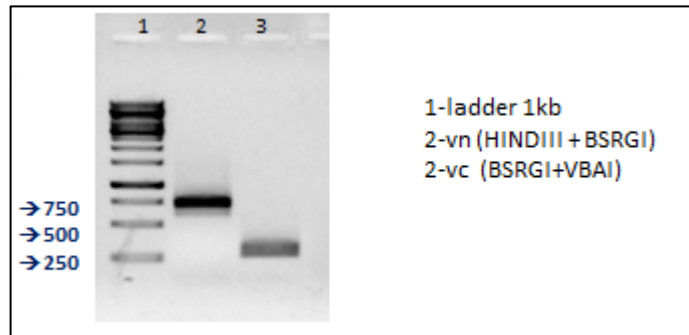


Figura 7: Digestión de fragmentos VN y VC

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En él se puede observar el DNA de los fragmentos VN173 y VC155 previa digestión con las enzimas BSRGI, HINDIII y XBAI, los cuales presentaron las bandas esperadas, 715 pb para VN (carril 2 ) y 250 pb para VC (carril 3). En el carril 1, se observa el marcador de peso molecular de 1kb.

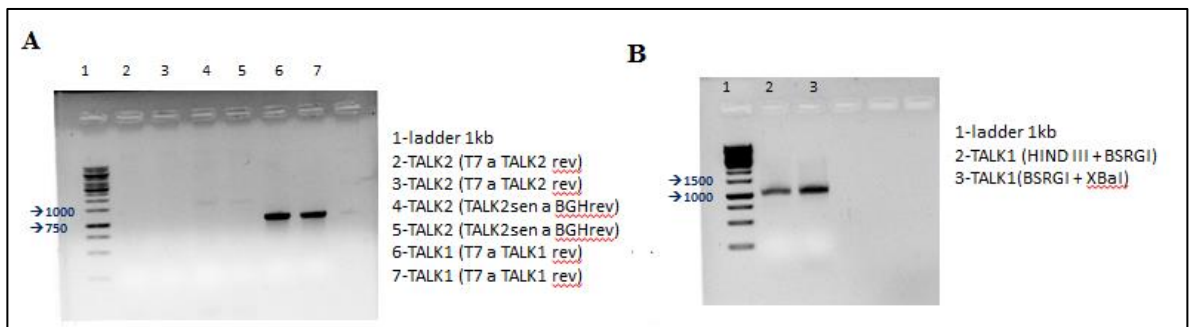


Figura 8: Producto de amplificación por medio de PCR y Digestión de DNA de canal

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En A, se puede observar las bandas de DNA del canal TALK-1 el cual presento una banda cercana a los 960 pb que era lo esperado, en el caso de TALK-2 no se observó amplificación de DNA. En B, se puede observar el DNA de TALK-1 previa digestión con las enzimas HINDIII, BSRGI y XBAI, el cual presento una banda cercana a los 951pb para el carril 2 que era lo esperado y 1119 para el carril 3, que era lo esperado para la segunda digestión En el carril 1, se observa el marcador de peso molecular de 1kb.

En la Figura 9, podemos observar que los efectivamente los constructos incorporados a las células DH5 $\alpha$ , se integraron de manera efectiva; en ella podemos ver bandas cercanas a los 715 pb para aquellos constructos que tienen unido el fragmento VN de GFP, mientras que se observarían bandas cercanas a los 250 pb, para aquellos constructos unidos al fragmento VC de GFP. Siendo en este caso, las digestiones post transformación, un paso en el que corroboramos que esas células resistentes a ampicilina además de sobrevivir, tienen el material genético de interés incorporado.

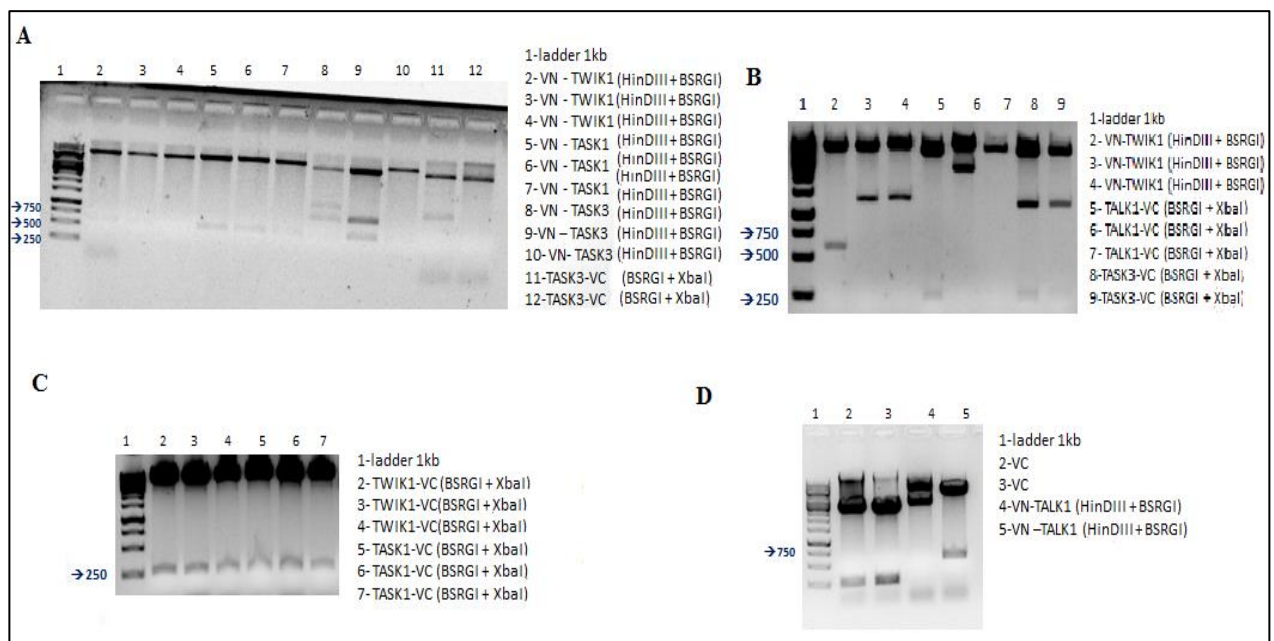


Figura 9: Digestión de constructos generados, previa ligación y transformación

*Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En A, se puede observar la banda de DNA del fragmento VN173 presentando las bandas esperadas, cercanas a los 715 pb para los carriles 5, 6, 8 y 9; y ausencia de bandas cercanas a los 250 pb para VC155 de la proteína fluorescente GFP. En B, se observan resultados positivos para los carriles 2, 5 y 8. Mientras que en C, todos los carriles presentaron*

*resultados positivos para los constructos con VC incorporados. Finalmente en D, se observa un resultado positivo para el constructo estudiado en el carril 5.*

*En el carril 1, perteneciente a A, B, C y D se observa el marcador de peso molecular de 1kb.*

Es así, como dentro de numerosos ensayos de digestión previa transformación del DNA, se logró generar los pares necesarios de todos los canales estudiados, unidos a los diferentes fragmentos de GFP, VN y VC por cada canal en estudio.

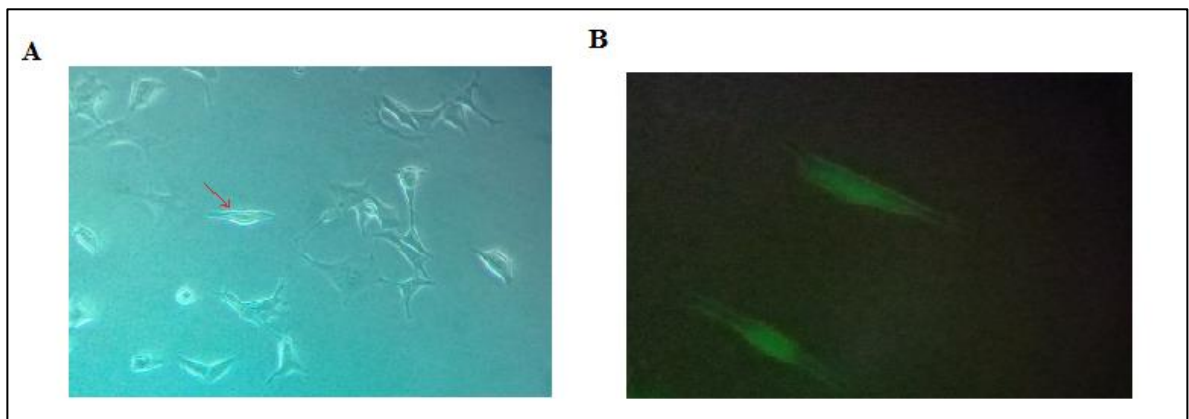


Figura 10: Visualización microscópica de homodímeros

*En A, se observa la luminosidad esperable para células que incorporaron satisfactoriamente el DNA estudiado. En B, el análisis de BiFC para el homodímeros de TASK-3, observándose fluorescencia verde ante el resultado positivo en la complementariedad de los fragmentos de GFP.*

La Figura 10 B, encontramos la formación de un complejo fluorescente verde, tal cual era lo esperable. Mostrándose resultados similares para el canal TALK-1; y resultados negativos para TWIK-1 y TASK-1, donde no se censo fluorescencia. Siendo de esta manera la figura 10 B, una guía de lo que debiera observarse ante la presencia de homodimerización positiva. En A, en cambio, se ve el resultado positivo de la formación del complejo ante la ausencia de filtros que permiten la observación del complejo, siendo, la luminiscencia observada una guía ante resultados positivos.

## DISCUSIÓN

Los canales de potasio K2P para ser funcionales necesitan ensamblarse como dímeros a diferencia de los demás grupos de canales de potasio que se ensamblan como tetrámeros. Si bien la existencia de estos como homodímeros de la familia K2P ya es bien conocida, el estudio de la heterodimerización de estos aún sigue siendo una incógnita a dilucidar.

Es por ello que se generaron constructos de los canales K2P en estudio (TALK-1, TASK1, TASK-3 y TWIK-1) con fragmentos de la proteína GFP, con la finalidad de establecer homodímeros como un control positivo de la técnica y posteriormente el estudio de heterodímeros entre los canales estudiados.

La etapa anterior a la generación de los constructos, requirió de la amplificación de los fragmentos VN-173 y VC-155 de la proteína fluorescente GFP, la que logro llevarse a cabo de manera satisfactoria como bien se observa en la Figura 5, encontrándose los fragmentos estudiados dentro de las bandas esperadas; siendo en el caso de VN-173 715 pb y para el fragmento VC-155 250 pb. Las etapas posteriores también se lograron a cabalidad encontrándose los mismos fragmentos para la transformación post ligación y la consiguiente digestión de los fragmentos. Lo que permitió tener una parte fundamental del ensayo; los fragmentos que formaran GFP para el posterior análisis de fluorescencia.

Los constructos de los canales, lograron generarse, si bien con resultados satisfactorios, requirió de numerosos intentos, posiblemente al ser un proceso operador dependiente que fue realizado por alguien no habituado al manejo de técnicas de biología molecular. Como bien se muestra en la figura número cuatro de la sección de resultados.

En cuanto a la cotransfección transitoria logro resultados positivos, que no requirió de numerosos intentos como es el caso de los pasos anteriores. Lográndose de esta manera la introducción del material genético de los constructos en células eucariotas para la posterior evaluación de la formación o no de estas combinaciones en una célula animal, en contraste con la transformación en la que se introdujo el *DNA* de los diferentes constructos en células procariotas.

La evaluación de fluorescencia de los canales se logró de manera favorable, pero con resultados parcialmente positivos a los esperados. En este trabajo se identificaron homodímeros de los canales TALK-1 y TASK-3 utilizando *BiFC* a partir de la observación de fluorescencia de color verde en las células Hek-263 a las que se les introdujo *el DNA* correspondiente, hecho contrastado con la ausencia de fluorescencia para los homodímeros de TWIK-1 y TASK-1.

Los canales TWIK-1 y TASK-1 debieron emitir fluorescencia al ser controles positivos para la posterior etapa de heterodimerización entre estos canales. Ya que como es bien sabido, “los canales K2P, los cuales forman homodímeros, donde cada subunidad es caracterizada por poseer cuatro dominios de transmembrana y 2 dominios formadores de poro”<sup>[11]</sup> son funcionales de esta manera. Esto puede explicarse ante una posible conformación *swapped* para el caso de TASK-1, donde los extremos C-terminal y N-terminal están a una distancia superior a la necesaria para formar GFP lo que requeriría de otro tipo de control que permitiera evaluar la posibilidad de pesquisar las conformaciones *swapped* y *non swapped*. Para el caso particular de TWIK-1, no se logró evidenciar fluorescencia en la célula completa, lo que se observo fue fluorescencia dentro de la célula, posiblemente encapsulada al no lograrse un ensamblaje correcto o ante una etapa fallida en

alguna etapa anterior a la visualización, requiriéndose análisis posteriores para este fenómeno.

Si bien, el análisis de la dimerización de los canales K2P estudiados dio resultados divergentes e interesantes, podemos decir que si sirvió para confirmar homodimerización como es el caso del canal TAK-1, sin embargo, se requiere de otro tipo de controles que consideren las distintas conformaciones espaciales, descartando de esta manera errores atribuibles a las etapas posteriores del ensayo. A pesar de que “El análisis *BiFC* no requiere información sobre las estructuras de los socios de interacción o de su interfaz de interacción. La asociación de los fragmentos de proteínas fluorescentes fusionados con los compañeros de interacción no requiere que los compañeros de interacción coloquen los fragmentos en una orientación específica o dentro de una distancia fija entre sí. Sin embargo, las restricciones estéricas pueden evitar la asociación de los fragmentos dentro de un complejo. Los fragmentos deben tener suficiente libertad de movimiento en el complejo para colisionar entre sí y someterse al plegamiento inducido mutuamente requerido para formar la estructura del barril  $\beta$ ” Siendo por lo tanto, el factor estérico lo que impediría la formación de la fluorescencia entre los canales con resultados negativos y no la distancia en sí.

“El desafío de implementar una prueba de *screening* para interacción de parejas es que los niveles de expresión de diferentes proteínas de fusión en literatura probablemente varíen en un amplio rango y es posible que no reflejen los niveles de expresión de las proteínas endógenas correspondientes. Por lo tanto, es probable que las diferencias en la señal de *BiFC* se vean afectadas por una variedad de factores no relacionados con la eficiencia de la interacción de la proteína.”<sup>[6]</sup> Lo cual podría explicar la ausencia de fluorescencia en los demás canales.

A pesar de las limitaciones anteriormente mencionadas, *BiFC* sigue siendo una técnica sencilla y rápida, que sigue ganando adeptos ya sea por su la visualización simple o por las condiciones celulares estudiables. Logrando de esta manera, consolidarse como una técnica de interés con futuros usos, como lo es el uso de diversas proteínas fluorescentes en un mismo ensayo para el estudio de múltiples interacciones proteicas.



## CONCLUSIONES

Los constructos generados de los canales de la familia K2P en estudio, se unieron con éxito a los fragmentos de la proteína GFP, obteniéndose de igual forma resultados positivos para el proceso posterior de cotransfección para la posterior evaluación de la técnica.

A partir de la evaluación de la fluorescencia, se puede aseverar que la complementación bimolecular fluorescente (*BiFC*) es capaz de identificar la formación de homodímeros en canales K2P, sin embargo, esto parece estar ligado a la conformación espacial que adopten dichos dímeros.

Este estudio preliminar, abre puertas para el estudio posterior de heterodímeros de esta familia de canales, homologable a otras familias de canales diferentes; además, abre la posibilidad de estudio de las conformaciones *swapped* y *non-swapped* de los distintos canales K2P; incógnita que aún no se ha develado del todo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Islas, L., Gómora, J., Fernández, F., Bargas, J., Galarraga, E., González, H., Fanjul, M., Fuentes, B., Moreno, et al. *Biología funcional de los animales. Vol. 2. Una neurofisiología comparada*. 2nd ed. [internet] Mexico, D.F: Maria Luisa Fanjul de Moles, Marcia Hiriart Urdanivia; 2009 [Consultado 2018 nov 5]. pp.63, 65-66. Disponible desde: <https://books.google.cl/books?id=lehyTphzZZ0C&pg=PA65&dq=canales+de+potasio+2+p+oros&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEWjXo6TsnrzeAhXFC5AKHUYWB3gQ6AEIMDAB#v=onepage&q=canales%20de%20potasio%202%20poros&f=false>
2. Feliciangeli, S., Chatelain, F., Bichet, D. and Lesage, F. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *The Journal of Physiology*. 2015; 593(12): 2587-2603
3. Niemeyer, M., Cid, L., Gonzalez, W. and Sepulveda, F. Gating, Regulation, and Structure in K2P K+ Channels: In Varietate Concordia?. *Molecular Pharmacology*. 2016; 90(3): 309-317.
4. Vijay Renigunta, Günter Schlichthörl & Jürgen Daut. Much more than a leak: structure and function of K2P-channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2015; 467:867–894
5. Honoré, E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8(4):251-261.
6. Kerppola T. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol* 2008; 85: 431-470.
7. Deng Y, Huang Z, Li Y, Xing D, Zhang Z. Advances in molecular biophotonics. Walter de Gruyter GmbH & Co KG; 2017.
8. Kodama Y, Hu C. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*. 2012;53(5).
9. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol*. 1996; 14:1246–1251

10. Kerppola T. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols*. 2006; 1(3):1278-1286.
11. Cid, P., & Reyes, A. Estudio de la expresión del canal de potasio TASK-2 durante el desarrollo y en el riñón adulto: utilización de un ratón nulo para el canal que expresa  $\beta$  galactosidasa como gen Reportero [ Tesis Doctoral]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2013