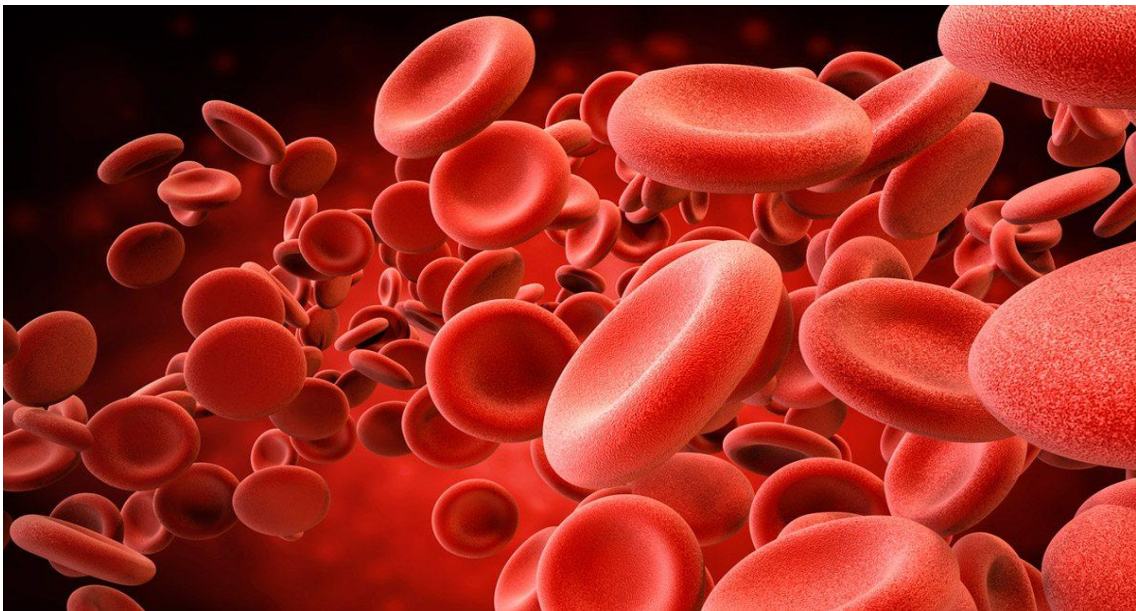


Análisis de la interacción entre KLF1 (Krüppel like factor 1) y Elongin C.

Analysis of the interaction between KLF1 (Krüppel like factor 1) and Elongin C.



Trabajo de fin de grado

Beatriz Díaz Reyes

Tutorizado por Mirosława Siatecka y Celedonio González Díaz

Grado en Biología

Septiembre de 2019

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Abstract	4
3. Introducción	5
3.1 <i>EKLF/KLF1</i>	5
3.1.1 <i>Estructura de KLF1</i>	5
3.1.2 <i>Funciones de KLF1 y su rol en la eritropoyesis</i>	6
3.1.3 <i>Mecanismos de regulación de la actividad de KLF1</i>	6
3.2 <i>Elongin C (EloC)</i>	9
4. Objetivos.....	10
5. Material	11
5.1 <i>Plásmido PSG5-EloC</i>	11
5.2 <i>Células XLI-Blue</i>	12
5.3 <i>Células cos-7</i>	12
6. Métodos	13
6.1 <i>Esquema general de los pasos seguidos durante el estudio</i>	13
6.2 <i>Análisis del ADN del plásmido pGS5-EloC</i>	14
6.2.1 <i>Transformación del plásmido pGS5-EloC en células XLI-Blue</i>	14
6.2.2 <i>Masterplate</i>	14
6.2.3 <i>Aislamiento del plásmido y medida de la concentración de ADN</i>	14
6.2.4 <i>Hidrólisis del ADN con la enzima de restricción BglII</i>	15
6.2.5 <i>Monitorización de la hidrólisis de la enzima de restricción con un gel de agarosa</i> 15	
6.3 <i>Estudio de la interacción entre KLF1 y Elo C</i>	15
6.3.1 <i>Transfección (introducción del ADN dentro de células eucariotas cos-7)</i>	15
6.3.2 <i>Aislamiento del extracto proteico</i>	16
6.3.3 <i>Inmunoprecipitación</i>	16
6.3.4 <i>Western Blot</i>	17
7. Resultados y discusión.....	20
7.1 <i>Análisis del plásmido de ADN</i>	20
7.2 <i>Transfección y medida de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford</i>	22
7.3 <i>Análisis de la expresión proteica de Elo C en células eucariotas</i>	22
7.4 <i>Análisis de la interacción entre KLF1 y Elo C</i>	23
7.4.1 <i>Input con anticuerpo 7b2</i>	23
7.4.2 <i>Input con anticuerpo anti-flag</i>	24

7.4.3	<i>Input con anticuerpo anti-GAPDH</i>	24
7.5	<i>Análisis mediante co-inmunoprecipitación de la interacción directa entre proteínas</i> 25	
8.	Conclusiones	28
9.	Conclusions	29
10.	Bibliografía	30

1. Resumen

KLF1 (Krüppel like factor 1), también conocido como EKLF (Erythroid Krüppel like factor) es un factor de transcripción de dedo de zinc (C_2H_2) específico de los eritrocitos que es esencial para la estructura y expresión adecuada de muchos genes eritroides implicados en la estructura y función de los glóbulos rojos, por ejemplo, del gen de la β -globina (1). KLF1 está regulado por interacciones con diversas proteínas, y en este estudio se ha trabajado con un nuevo candidato para la interacción proteína-proteína con KLF1, elongin C. Para estudiar la interacción de ambas proteínas lo primero que se hizo fue aislar el ADN plasmídico que contiene la secuencia de ADNc de elongin C. Después, se procedió a verificar la expresión de ADN en células eucariotas (células COS-7). Finalmente, se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra la proteína Elo C para comprobar si había co-inmunoprecipitación de la otra proteína. Concluimos que existe una interacción directa entre KLF1 y elongin C, por lo que encontramos un nuevo factor que puede jugar un papel importante en el funcionamiento de KLF1, pudiendo tener relevancia en el proceso de maduración de los glóbulos rojos.

Palabras clave: Factor de transcripción, eritrocitos, ADN, inmunoprecipitación.

2. Abstract

Erythroid Krüppel-like factor/Krüppel-like factor 1 (EKLF/KLF1) is an erythroid specific, C₂H₂ zinc finger transcription factor that is essential for the proper chromatin structure and expression of many erythroid genes involved in red blood cell structure and function e.g. β -globin. KLF1 is regulated by interactions with other proteins. From a mass spectrometer analysis, we have a new protein-protein interaction candidate for KLF1. It is elongin C. In order to study the interaction of KLF1 and elongin C, we first isolated the plasmid DNA containing the cDNA sequence of it. Then we verified that this cDNA is expressed in eukaryotic cells (COS 7 cells). Finally, in order to study the interaction, an immunoprecipitation with anti-Flag antibodies was carried out. We conclude that there is a direct interaction between KLF1 and elongin C, thus we found a new protein partner that may be important for the regulation of transcription factor KLF1.

Key words: Transcription factor, erythroid, DNA, immunoprecipitation

3. Introducción

3.1 EKLF/KLF1

Los factores de transcripción son importantes proteínas que controlan la tasa de transcripción del ADN al ARNm, al unirse a regiones específicas del ADN. EKLF/KLF1 es un factor de transcripción de células eucariotas codificado por el gen del mismo nombre (*Klf1*) que fue descubierto en 1993 por Iran Miller y James Bieker. Su nombre proviene de su limitada expresión en las células eritroides y su parecido con la proteína Krüppel que se encuentra presente en *Drosophila melanogaster*. Los KLFs se caracterizan por poseer un dominio de unión al ADN altamente conservado que pertenece a la clase de dedo de zinc (C_2H_2) (2). La actividad reguladora de KLF1 viene dada por su capacidad de unirse a la secuencia CCACACCCT en su dominio de unión al ADN, un elemento esencial del promotor de la globina B (3). Las mutaciones en dicha secuencia pueden causar varias enfermedades como la anemia diseritropoyética congénita tipo IV (CDA, tipo IV), la anemia neonatal (Nan) o el fenotipo de grupo sanguíneo de inhibidores luteranos (In(Lu)). Por tanto, es un importante regulador de la eritropoyesis (proceso de maduración de los glóbulos rojos) que tiene un papel en todas las etapas del desarrollo y por lo tanto se expresa en las células eritroides del saco vitelino, el hígado fetal y la médula ósea adulta (2).

3.1.1 Estructura de KLF1

KLF1 contiene 2 dominios (Figura 1). El dominio de transactivación se encuentra en el extremo N-terminal, funciona mediante interacciones con otros factores de transcripción y remodeladores de la cromatina. El segundo dominio es el dominio de unión al ADN ubicado en el extremo C-terminal de KLF1. Este dominio incluye 3 motivos de dedo de zinc tipo C_2H_2 muy evolucionados y conservados. La proteína del dedo de zinc se une a la secuencia de ADN CCACACCCT que se encuentra en el promotor de la beta globina de la hemoglobina.

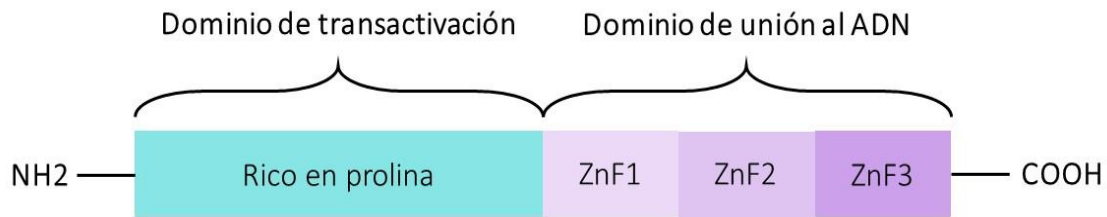


Figura 1. Esquema de la estructura de KLF1. El dominio de transactivación está localizado en el extremo N-terminal de la proteína KLF1. Tres motivos de dedo de zinc consecutivos están localizados en el extremo C-terminal. (4)

3.1.2 Funciones de KLF1 y su rol en la eritropoyesis

KLF1 regula la biología de los eritrocitos mediante una amplia variedad de mecanismos, incluyendo la activación y represión de genes mediante la regulación de la configuración de la cromatina, la iniciación y la elongación transcripcional, y la localización de los genes en las fábricas de transcripción en el núcleo (5).

Hay 3 aspectos principales de la eritropoyesis en los que KLF1 desempeña funciones cruciales:

- En la etapa de progenitor megacariocito-eritroide, donde participa en el mantenimiento del linaje eritroide.
- Durante la expansión global de la expresión de genes eritroides en linajes primitivos y definitivos, donde juega un papel directo en la activación de la globina. Activa una variedad de genes necesarios para el desarrollo de los glóbulos rojos: β -globina, la diana KLF1 mejor estudiada, y otros genes esenciales de los glóbulos rojos que intervienen en localizaciones y procesos diversos, incluyendo la membrana de los glóbulos rojos, el citoesqueleto, la biosíntesis del hemo, proteínas transmembrana, factores de transcripción y del ciclo celular, y los antígenos de los grupos sanguíneos.
- Durante la maduración terminal de los eritrocitos, donde ayuda a controlar la salida del ciclo celular. (2)

3.1.3 Mecanismos de regulación de la actividad de KLF1

3.1.3.1 Modificaciones post-traduccionales

Durante la eritropoyesis se producen numerosos mecanismos post-traduccionales (Tabla 1) para regular la actividad del KLF1. Los mecanismos que se han descubierto hasta ahora son algunos como la **ubiquitinación**, **acetilación**, **fosforilación** y

sumoilación. A continuación, discuto brevemente algunas proteínas que se ha demostrado que interactúan con KLF1 en relación con alguno de estos mecanismos post-traduccionales.

- Sobre la actividad de la acetilación, mSin3A (Paired amphipathic helix Protein) y HDAC1 (Histone deacetylase 1) se han relacionado con una función de co-represión en la eritropoyesis. Hay evidencias que confirman la interacción directa de mSin3A con KLF1, la cual tiene la capacidad de reclutar HDACs al complejo (estableciendo una interacción indirecta). Además, también se ha observado una interacción directa entre HDAC1 y KLF1. Ambas proteínas actúan en el dominio de los dedos de zinc (6).
- Además, otra modificación post-traducciona que tiene relevancia en la activación de la globina b es la acetilación de KLF1 en la lisina 288 (7). Esta acetilación la realizan las acetiltransferasas CBP (CREB Binding Protein acetyltransferase), p300 y PyACF (p300/CBP-associated factor). Sin embargo, sus interacciones con estas histonas acetiltransferasas no son equivalentes, ya que el CBP y p300 utilizan KLF1 como sustrato para la acetilación en su región de activación. Tanto CBP como p300 mejoran la activación transcripcional de EKLF sobre el promotor de la globina b en las células eritroides (8).
- En términos de fosforilación, KLF1 es fosforilado en residuos de serina y treonina dentro de su región de transactivación (9).
- Se ha demostrado que la familia PIAS (inhibidor de proteína de la STAT activada) participa en la regulación de KLF1 de diferentes maneras. PIAS1 promueve la sumoilación de KLF1 de una manera dependiente de la dosis y PIAS1 es la ligasa E3 específica del KLF1 (10). Por el contrario, PIAS3 fue identificado como un co-represor transcripcional de KLF1 en ausencia de sumoilación (14).
- En relación con la ubiquitinación, se ha demostrado que la inhibición del proteosoma provoca un aumento del nivel de KLF1. Por esta razón, se relaciona con el complejo proteosómico como la maquinaria que lleva a cabo la degradación de KLF1. Además, se ha demostrado que el KLF1 puede ubicarse in vivo (1).

3.1.3.2 Otras interacciones proteína-proteína

Además de las modificaciones post-traduccionales, existen otro tipo de mecanismos (Tabla 1) que son relevantes para la regulación de la actividad de KLF1. Así, encontramos que hay otras proteínas que interactúan directamente con KLF1, tales como:

- La familia SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) de complejos remodeladores de cromatina juega un papel clave para facilitar la unión de factores de transcripción específicos al ADN nucleosomal. Los dominios de unión al ADN (DBDs) de varias proteínas de dedo de zinc, incluyendo EKLF, interactúan directamente con SWI/SNF para generar hipersensibilidad a la DNasa I dentro del promotor de globina ensamblado con cromatina (11).
- La fosfatasa Ppm1b (Protein phosphatase 1B) tiene una doble función en dos etapas diferentes de la eritropoyesis: interactúa directamente con KLF1 a través de su secuencia PEST1 jugando un papel en el mantenimiento del linaje y una interacción indirecta con el dominio del dedo de zinc con una función de estabilidad de KLF1 (12).
- La interacción entre KLF1 y la chaperona de histonas HIRA (histone cell cycle regulation-defective homolog A) se ha relacionado con la forma en que KLF1 interactúa con el promotor de β -globina (13).

Proteína	Lugar de interacción	Función
CBP/P300 acetiltransferasas	Dominio de unión al ADN	Mejora la actividad transcripcional de KLF1
H3/H3.3	Dominio de unión al ADN	Histonas
HIRA	Dominio de unión al ADN	Chaperonas epigenéticas para histonas
mSin3A	Dominio de unión al ADN	Co-represor
HDAC1	Dominio de unión al ADN	Co-represor
SWI/SNF	Dominio de unión al ADN	Remodelador epigenético de la cromatina
Ppm1b (fosfatasa)	PEST1 sequence in EKLF (amino acids 50–70)	Mantenimiento del linaje dentro de la eritropoyesis
PIAS1	Dominio de unión al ADN	PIAS1 sirve como una ligasa E3 para la sumoilación de KLF1
PIAS3	Proteína completa	Represión de la actividad de KLF1
Quinasa CKII	Dominio de unión al ADN (Thr-41)	Fosforilación

Tabla 1. Resumen de las proteínas descubiertas que interactúan con KLF1. En la tabla podemos observar la abreviación de las proteínas (columna 1), el dominio donde se produce la interacción (columna 2) y la función principal de dicha proteína (columna 3).

3.2 Elongin C (Elo C)

Esta proteína es una subunidad del complejo Elongin (también conocido como SIII), fue inicialmente purificado a partir de extractos de hígado de rata. La función que llevó al descubrimiento de este complejo y de donde proviene su nombre es de su capacidad de aumentar la tasa catalítica de ARN polimerasa II (ARN-PolII) (15).

Estructuralmente, el complejo de Elongin está constituido por tres subunidades (de 110, 18 y 16 KDa respectivamente), una subunidad catalítica llamada Elongin A (Elo A), responsable de la transcripción y dos subunidades reguladoras conocidas como Elongin B (Elo B) y Elongin C (Elo C). Mientras que Elo C aumenta la actividad de la Elo A, Elo B actúa como chaperona facilitando la formación del complejo Elongin y aumentando su estabilidad (15)(16).

Además de esta función, se ha relacionado al complejo BC con la formación de una ubiquitina ligasa E3 (15). Específicamente se ha visto relacionado con las ligasas cullin-RING (CRLs) de múltiples subunidades son la mayor familia de ligasas de ubiquitina E3 en humanos (17).

Por último, existen varios estudios recientes que afirman que Elongin BC está asociado con Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) en células madre pluripotentes (18). Este complejo cumple funciones de histona metiltransferasa, principalmente sobre la histona 3 (H3). La asociación entre Elongin BC y PRC2 es mediante el factor asociado EPOP (Elongin BC y Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein) (18).

4. Objetivos

El equipo de investigación en el que he realizado mi trabajo estaba interesado en estudiar una nueva interacción proteína-proteína con KLF1. Los resultados iniciales se obtuvieron a partir de un análisis de espectrometría de masas tras la inmunoprecipitación de los complejos KLF1 con otras proteínas. Uno de los candidatos como proteína que interactúa con KLF1 es la elongin C.

El objetivo de mi estudio fue verificar si las interacciones KLF1:Elongin C son directas. Para ello fue necesario aislar el ADN del plásmido que contiene el gen de la elongin C, probar si este gen se expresa en las células eucariotas, y finalmente analizar mediante co-inmunoprecipitación la posible interacción directa entre las proteínas KLF1 y elongin C.

5. Material

5.1 Plásmido PSG5-EloC

El vector utilizado para la transformación fue el plásmido pSG5 (Figura 2) con la inserción de nuestra proteína de interés, elongin C (Figura 3). El tamaño del vector es de 1076 pb.

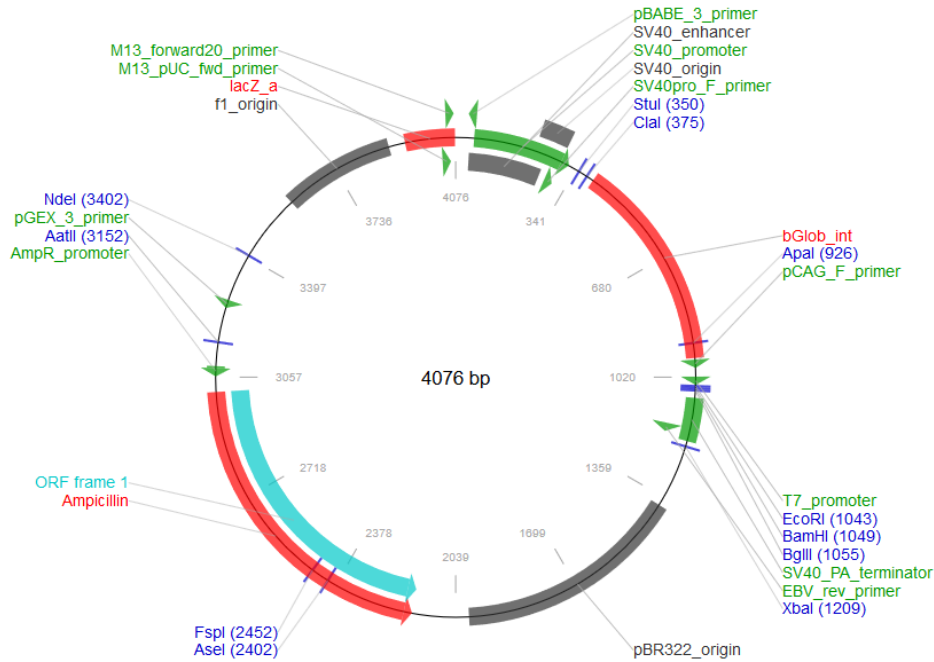


Figura 2. Esquema general del plásmido usado durante la transformación. En el esquema se muestra el tamaño del plásmido (4076 pb), la localización de los genes de resistencia a antibióticos, las dianas para enzimas de restricción, sitios de unión de oligonucleótidos, etc.

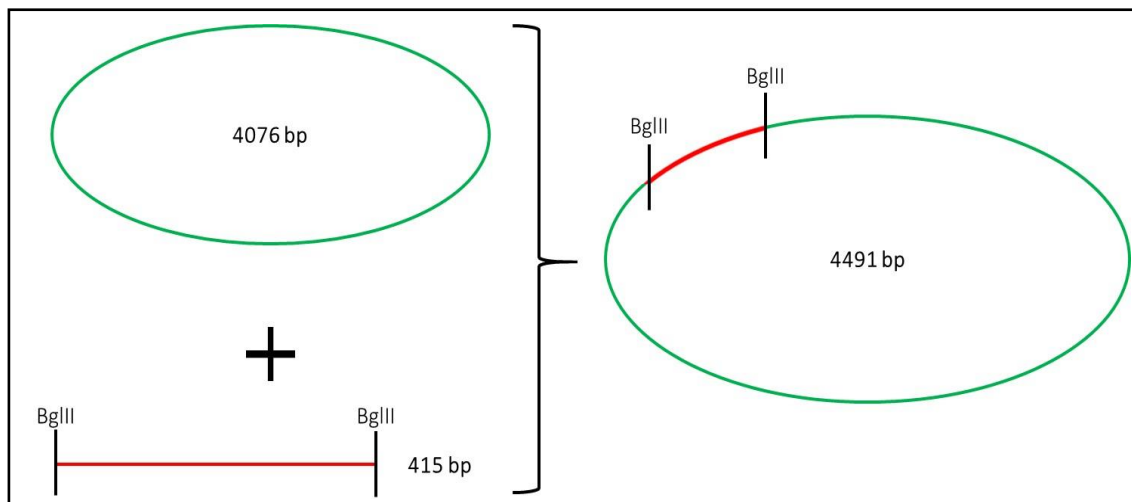


Figura 3. Construcción del plásmido que contiene el gen de la proteína EloC. El vector (pSG5) y el inserto (EloC) están fusionados juntos formando el plásmido recombinante (4491pb).

5.2 Células XLI-Blue

La cepa XLI-Blue es una línea de células procariotas ampliamente utilizadas para la rutina de clonación con el fin de propagar vectores de plásmidos. En esta cepa se puede utilizar la detección del blanco/azul con X-gal de las colonias bacterianas, para determinar qué colonias contienen el plásmido recombinante.

5.3 Células cos-7

La cepa celular COS-7 (CV-1 en origen con genes SV40) fue establecida a principios de la década de 1980 por el profesor japonés Yakov Gluzman. Se originó a partir de la línea de células CV-1 de fibroblastos de riñón de mono verde africano transformadas por una cepa mutante del virus Simian 40 (SV40) que codifica el antígeno T de tipo salvaje. COS-7 se caracteriza por su crecimiento similar a los fibroblastos y su susceptibilidad a los virus, lo que los convierte en una línea celular común utilizada en investigación y en una buena elección para experimentos de transfección de plásmidos de ADN. Cada tipo de KLF1 (WT, Nan y CDA) necesario para este estudio fue aislado de las células COS-7 (como un extracto de proteína cruda) que habían sido transfectadas previamente con plásmidos que contenían un tipo específico de KLF1.

6. Métodos

6.1 Esquema general de los pasos seguidos durante el estudio

1. Transformación del plásmido pGS5-Elo C (Flag-tag) en células competentes XL1-blue.
2. Aislamiento del plásmido y medida de la concentración de ADN (nanodrop).
3. Hidrólisis de plásmido aislado mediante enzimas de restricción (BglII).
4. Monitorización de la hidrólisis en gel de agarosa.
5. Transfección del ADN en células eucariotas cos-7.
6. Aislamiento del extracto de proteínas a partir de las células cos-7.
7. Análisis de las proteínas en un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 12%.
8. Transferencia del extracto proteico del gel SDS a una membrana.
9. Incubación de la membrana con anticuerpos anti-Flag.
10. Transfección del ADN de KLF1 y Elo C en células eucariotas cos-7.
11. Aislamiento de los extractos proteicos.
12. Inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Flag.
13. Análisis de las proteínas en un gel SDS-PAGE al 12%.
14. Transferencia de extracto proteico del gel SDS a una membrana.
15. Incubación de la membrana con anticuerpos anti-Flag y anti-KLF1.

Dividimos el trabajo de laboratorio en 3 etapas: la primera contiene de los pasos 1 al 4, finalizando la etapa con el ADN de Elo C aislado. La segunda etapa, de los pasos 5 al 9, en la que verificamos la expresión de Elo C en las células eucariotas (cos-7). Y la tercera etapa, que conforma de los pasos 10 al 15, en la que se realiza el análisis in situ de la interacción llevando a cabo una inmunoprecipitación.

6.2 Análisis del ADN del plásmido pGS5-EloC

6.2.1 Transformación del plásmido pGS5-EloC en células XLI-Blue

Para la transformación usé 50 nanogramos del plásmido pSG5 – Elo C y 30 μ l de la bacteria competente. La concentración inicial era de 217 ng/ μ l y queríamos obtener un volumen final de 2 μ l, lo que corresponde a una concentración final de 25 ng/ μ l.

$$217\text{ng} \times 1\mu\text{l} = 25\text{ng} \times X\mu\text{l} \rightarrow X = 8,68 \mu\text{l}$$

Así pues, añadimos 7,68 μ l de agua para obtener la concentración deseada.

Después de añadir los 50 ng del plásmido a los 30 μ l de la bacteria sometimos la mezcla a un choque térmico (55 segundos a 42°C). El choque térmico permite que espacios de la membrana plasmática de las bacterias se abran para facilitar la entrada de los plásmidos. A continuación, añadimos 300 μ l de medio LB y lo incubamos a 37°C durante 30 minutos en agitación.

Por último, centrifugamos la mezcla, desechamos el sobrenadante, añadimos 100 μ l del medio y distribuimos el total en dos placas de Petri, una con el 10% y otra con el 90%.

6.2.2 Masterplate

Primero de todo realizamos un recuento de las colonias en la placa del 10% para conocer la eficacia de la transformación de cara a futuros experimentos.

Después, para preparar la *masterplate*, tomamos algunas colonias de la placa de Petri e hicimos una especie de cuadrícula en una nueva placa de Petri con cada una de las colonias, asegurándonos de que quedaban bien separadas. Este paso es esencial para obtener un gran número de la misma colonia y así tener gran cantidad del plásmido.

6.2.3 Aislamiento del plásmido y medida de la concentración de ADN

Antes de comenzar con el aislamiento del plásmido preparamos un stock para futuros experimentos (0,5 ml de la bacteria más 0,5 ml de glicerol 50%), que fue congelado a -80°C.

Para el aislamiento del plásmido empleamos el kit Plasmid Midi AX de A&A Biotechnology, y el DNA fue eluido en tampón TE (Tris-EDTA). La concentración de ADN resultante fue determinada en un espectrofotómetro Nano-drop (Thermo Scientific).

6.2.4 Hidrólisis del ADN con la enzima de restricción BglII

Para preparar la mezcla de la hidrólisis seguimos la Tabla 2.

Componente	Volumen
ADN 0,5 µg	5 µl
10x buffer FD	1,5 µl
Enzima BglII FD	0,5 µl
H ₂ O	8 µl
Total:	15 µl

Tabla 2. Composición de la mezcla de la enzima de restricción.

6.2.5 Monitorización de la hidrólisis de la enzima de restricción con un gel de agarosa

Para estudiar la eficacia de la hidrólisis preparamos un gel de agarosa (0,3 gr de agarosa, 30 ml de 1xTBE (Tris-borato-EDTA) y bromuro de etidio). En esta electroforesis cargamos dos muestras de Elo C y dos muestras de KLF1 que había estado preparando mi compañera de laboratorio en paralelo.

6.3 Estudio de la interacción entre KLF1 y Elo C

6.3.1 Transfección (introducción del ADN dentro de células eucariotas cos-7)

Para acortar el trabajo de laboratorio realizamos la segunda y tercera etapa a la vez. Así, en vez de hacer la transfección solo de Elo C, la hicimos también del ADN de KLF1 y de USP7 (Ubiquitin specific processing protease 7), nuestro control positivo (ya se ha demostrado que interactúa con KLF1).

Lo primero que hicimos fue cambiar el medio de cultivo de las placas de Petri con el tejido cultivado. El medio elegido es el FBS (Fetal bovine serum) al 10% (90% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) más 10% FBS).

Después, preparamos los eppendorfs pertinentes y preparamos la siguiente mezcla:

- A: (OPTI-MEM RT 500 µl + ADN 10 µg total)
- B: (OPTI-MEM RT 500 µl + ViaFect 30 µl directamente a la incubación del medio a temperatura ambiente durante 5 min)

Después añadimos esta mezcla al medio por encima de las células, revolvimos durante 30 minutos e incubamos 48 horas a 37°C.

6.3.2 Aislamiento del extracto proteico

Una vez pasado el tiempo de incubación de las células cos-7, las lavamos con PBS (Phosphate-buffered saline) 2 veces y añadimos 0,5 ml de tripsina para separar las células, las incubamos 3 minutos a 37°C y comprobamos bajo el microscopio que las células se habían separado correctamente.

Después, añadimos DMEM + FBS para detener la acción de la tripsina y no dañar las células y las centrifugamos (1500 rpm), resuspendimos el pellet en PBS y volvimos a centrifugar. Tras esto, añadimos 1 ml de PBS lo pasamos a eppendorfs.

Centrifugamos (2000 rpm) a 4°C durante 5 minutos y añadimos tampón de lisis. Incubamos durante 30 minutos en hielo vortexeando la mezcla cada 5 minutos.

Por último, medimos la concentración de proteína mediante el método Bradford.

6.3.2.1 Método de Bradford para medir la concentración de proteínas

Primero preparamos un gradiente de BSA (Bovine serum albumin) para calcular la curva estándar añadiendo 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, y 2 µg de BSA a 800 µl de Bradford.

Después, preparamos los extractos proteicos (10µl de H₂O +1µl de extracto proteico). Añadimos 2 µl de la mezcla a 800 µl de Bradford.

Por último, metemos todo en el espectrofotómetro a 595 nm y calculamos la concentración de proteína y la cantidad total de proteína que tenemos.

6.3.3 Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación, utilizamos 8 µl de *magnetic beads* por muestra teniendo en cuenta que para cada muestra añadiremos los 8 µl de magnetic beads, el tampón de lisis y el extracto de proteínas teniendo en cuenta que la concentración de dichas proteínas tiene que ser de 1 µg/µl. Después, incubamos las muestras durante 4 horas en rotación en la sala fría. Una vez pasadas las 4 horas, usando el soporte magnético separamos las *magnetic beads* del sobrenadante y limpiamos las magnetic beads 3 veces con tampón de

lisis. Añadimos Laemmli buffer, desnaturalizamos durante 10 minutos a 95°C y guardamos en el congelado a -20°C.

6.3.4 Western Blot

Realizamos 4 western blot:

- El primero cargado con el marcador y Elo C, utilizamos el anticuerpo anti-Flag. (Monoclonal ANTI-FLAG A8592, sigma)

- El segundo fue el input de la inmunoprecipitación, cargado con: KLF1, USP7, KLF1 y USP7, Elo C y Elo C y KLF1. Utilizamos el anticuerpo anti-KLF1 (7b2, policlonal) como anticuerpo primario y un anticuerpo mouse anti-rabbit como anticuerpo secundario.

- El tercero fue el de la inmunoprecipitación, cargado también con KLF1, USP7, KLF1 y USP7, Elo C y Elo C y KLF1. Utilizamos los mismos anticuerpos que para el segundo.

- El cuarto fue cargado también con todas a excepción de KLF1 ya que no nos quedaba suficiente extracto. Este western blot se hizo con una finalidad de control y utilizamos primero el anticuerpo anti-Flag y, después, sobre la misma membrana incubamos anti-GAPDH (GAPDH (D16H11) como anticuerpo primario y con un Chicken anti-rabbit (ab6829, abcam) como anticuerpo secundario.

6.3.4.1 Gel SDS-PAGE

Primero hicimos los geles de acrilamida, en nuestro caso por el tamaño de las proteínas elegimos un gel al 12% (KLF1 = 37 KDa, EloC = 15 KDa, USP7 = 128KDa).

La composición del gel de acrilamida al 12% para dos geles es la que aparece en la Tabla 3.

Gel SDS-PAGE			
10% separating gel		4% stacking gel	
Acrilamida-Bisacrilamida	6,4 ml	Acrilamida-Bisacrilamida	0,8 ml
H ₂ O	5,3 ml	H ₂ O	9,324 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	4 ml	1,5M Tris-HCl pH 6,8	0,75 ml

10% SDS	160 μ l	10% SDS	60 μ l
10% APS	160 μ l	10% APS	60 μ l
TE-MED	16 μ l	TE-MED	6 μ l

Tabla 3. Composición del gel SDS-PAGE.

Los parámetros empleados para la electroforesis son los siguientes:

- 10 min 80V
- 1 hour 10 min 120V

6.3.4.2 Transferencia

Parámetros para la transferencia: 0,27A, 1:30 horas.

6.3.4.3 Incubación con anticuerpos

→ 7b2

Antes de la incubación con anticuerpos, sometimos a la membrana a una solución de bloqueo con leche al 5% diluida en TBST (tris buffered-saline and tween) durante una hora. Después, incubamos la membrana con los anticuerpos primarios (7b2) que se unen a KLF1 durante la noche. Al día siguiente, lavamos la membrana 3 veces durante 5 minutos con leche al 0,5% en TBST y agregamos el anticuerpo secundario Mouse-Anti Rabbit conjugado con HRP durante 1 hora. A continuación, lavamos la membrana dos veces en 10 ml de leche al 0,5% en TBST y cuatro veces en 10 ml de TBST en un agitador. Para sacarle la fotografía a la membrana, usamos 700 μ l de ECL (Enhanced Chemiluminescence) y se sacó una foto en el chemi-doc utilizando el programa Gene-SyS.

→ Anticuerpo anti-flag

Primero, mantuvimos la membrana en una solución de bloqueo de leche al 5% en TBST durante una hora. Tras esto, introdujimos el anticuerpo que estuvo incubando la membrana durante 2 horas en agitación. Una vez pasado el tiempo, lavamos la membrana 2 veces con leche al 0,5% en TBST durante 10 minutos y 5 veces con TBST durante 5 minutos cada vez. Para ver la membrana seguimos el mismo procedimiento que con el anticuerpo anterior.

→ Anti-GAPDH

Para incubar la membrana con este anticuerpo, primero tuvimos que lavar la membrana durante 15 minutos en TBST y después añadir un tampón de dispersión para eliminar el anticuerpo anterior durante 15 minutos. Después, lavamos la membrana en TBST y añadimos leche al 5% en TBST durante 1 hora. A continuación, añadimos el anticuerpo anti-GAPDH durante 1 hora, lavamos la membrana 3 veces en leche 0,5% en TBST y agregamos el anticuerpo secundario Chicken anti-rabbit durante una hora más. Por último, lavamos la membrana en leche al 0,5% en TBST 2 veces y 4 veces en TBST y sacamos la foto siguiendo el procedimiento de los otros anticuerpos.

7. Resultados y discusión

El primer objetivo de nuestra investigación fue obtener el ADN de elongin C, nuestra proteína de interés. Para ello utilizamos el plásmido pSG5 con el inserto de Elo C, que tuvimos que cultivar hasta obtener una cantidad suficiente para poder llevar a cabo los siguientes experimentos.

7.1 Análisis del plásmido de ADN

Después de la transformación, procedimos a contar el número de colonias (correspondientes a las bacterias individuales que habían crecido en el medio de cultivo) en la placa de Petri en la que cultivamos el 10% de las bacterias. Ya sabemos que estas colonias contienen el plásmido, si no fuera así, no tendría la capacidad de crecer en un medio de cultivo con ampicilina.

Para la transformación utilizamos 30 μ l de células competentes de bacterias XL-1 Blue y 50 ng del plásmido pSG5-EcoC. Obtuve aproximadamente 900 colonias de 3 μ l de bacterias transformadas. Estos datos nos ayudan a conocer la eficiencia de la transformación para estudios posteriores.

Después, aislamos el ADN del plásmido usando el kit de aislamiento de ADN y medimos la concentración de ADN.

La concentración de Elo C vía nanodrop fue: 2,55 μ g/ μ l. Teníamos 100 μ l de ADN, así que la cantidad total de ADN obtenida fue 255 μ g.

Esta es una información importante teniendo en cuenta que necesitamos saber la cantidad específica de ADN que debemos cargar en la electroforesis siguiente.

Una vez que confirmamos que hemos aislado con éxito el ADN, el siguiente paso es verificar que nuestro ADN se corresponde con nuestros genes de interés. Para ello, utilizaremos enzimas de restricción (enzimas que cortan el ADN en zonas específicas).

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En esta electroforesis cargamos tanto el ADN del plásmido completo de elongin C como el ADN digerido con enzimas de restricción (BglII). Con esta electroforesis encontramos que tanto el aislamiento como la hidrólisis se hicieron correctamente.

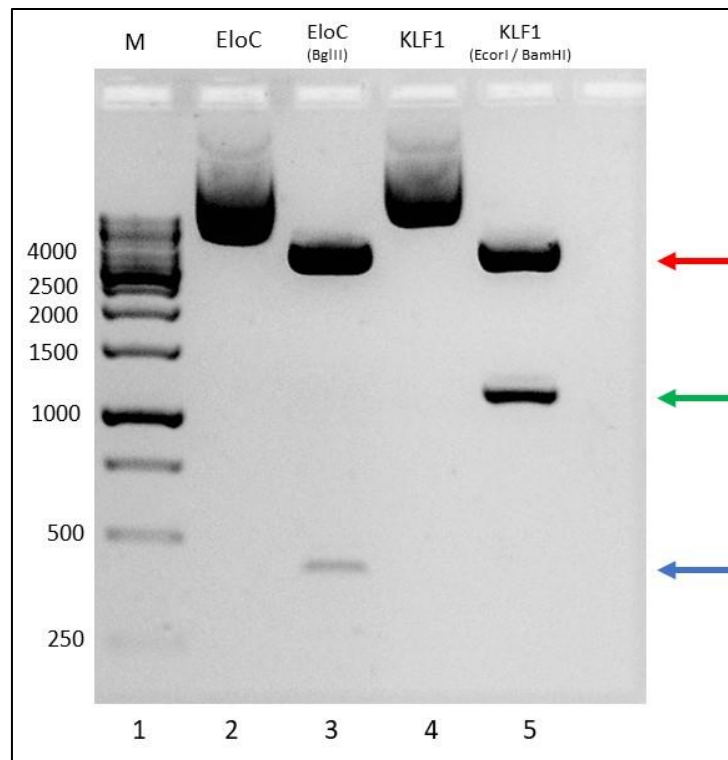


Figura 4. Gel de agarosa cargado con el ADN digerido y no digerido. Carriles: 1-Marcador de peso molecular, 2-EloC no digerido, 3-EloC digerido, 4-KLF1 no digerido, 5-KLF1 digerido. Los plásmidos no digeridos están ubicados en los carriles 2 y 5. El tamaño del plásmido no digerido es 4491 pb para elongin C y 5240 pb para KLF1. Los vectores de ambas proteínas están señalados por la flecha roja (tamaño=4076 pb). Elo C está señalada por la flecha azul (tamaño=415 pb). KLF1 está señalada por la flecha verde (tamaño=1164 pb).

En el gel de agarosa que podemos observar en la Figura 4 el carril número 2 (sin digestión) presenta una banda a la altura de 4491 pb, lo que se corresponde con el tamaño de pSG5-EcoC. Por lo tanto, podemos confirmar que nuestro plásmido tiene el inserto (Elo C) y que el tamaño es el esperado.

Por otro lado, en el carril número 3 de la Figura 4, podemos observar dos bandas, una que corresponde al vector (4076 pb) y la otra es la inserto (415 pb). De este modo, podemos confirmar que la digestión también se ha realizado correctamente, ya que nuestro inserto ha sido perfectamente separado del vector.

Con este gel también quisimos verificar los ADNs digeridos y sin digerir del plásmido con el que trabajó mi compañera de laboratorio con el que obtuvimos el ADN de KLF1. Así, en el carril 4 de la Figura 4 se observa el plásmido de KLF1 sin digestión cuyo tamaño es 5240 (el vector que es el mismo que para Elo C = 4076 pb) más el inserto, KLF1 (1164 pb)).

Por último, en el carril número 5 de la Figura 4 podemos observar que el plásmido fue digerido con dos enzimas de restricción (EcoRI y BamHI) con éxito. Obteniendo así el vector y el inserto perfectamente separados.

7.2 Transfección y medida de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford

Después de la transfección en las células cos-7, para conocer la concentración del extracto proteico llevamos a cabo el método de Bradford. Los resultados obtenidos son los podemos ver en la Tabla 5.

	Test tube	µg/µl
1	COS-7	3,81
2	KLF1	3,67
3	USP7	1,39
4	KLF1 + USP7	4,07
5	Elo C	5,27
6	KLF1 + Elo C	3,22

Tabla 5. Concentración de cada proteína calculada mediante el método de Bradford.

7.3 Análisis de la expresión proteica de Elo C en células eucariotas

Lo siguiente que queríamos verificar era la expresión de Elo C en las células eucariotas. Para ello, hicimos un gel SDS-PAGE al 12% para comprobar el tamaño y la presencia de Elo C.

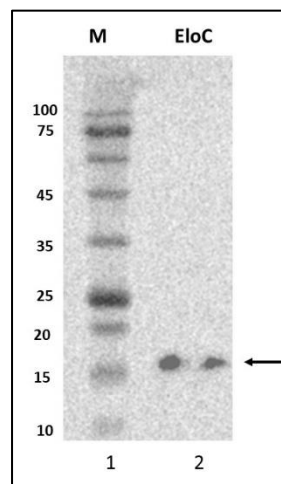


Figura 5- Análisis del nivel de expresión de Elo C en células eucariotas. Carriles: 1-Marcador de peso molecular, 2-Elongin C aislado (Flag-Tag). La banda que indica la expresión de Elo C en células eucariotas está señalada por una flecha.

Con este gel confirmamos la expresión de Elo C en las células eucariotas. Para este Western Blot utilizamos el anticuerpo anti-flag que nos permite ver Elo C. La banda tiene el tamaño esperado de ~15 KDa.

7.4 Análisis de la interacción entre KLF1 y Elo C

7.4.1 Input con anticuerpo 7b2

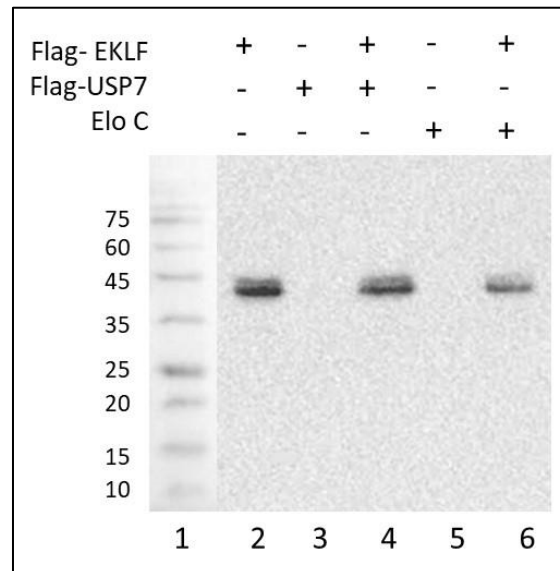


Figura 6. Análisis del nivel de expresión de las diferentes proteínas en las células eucariotas. Carriles: 1-Marcador de peso molecular, 2-KLF1, 3-USP7 (Flag-Tag), 4-KLF1 y USP7, 5-Elongin C (Flag-Tag), 6-KLF1 y Elongin C.

En este caso el anticuerpo utilizado fue el anticuerpo 7b2. Este anticuerpo actúa contra el KLF1. Por esta razón, después del tratamiento sólo podemos ver en la Figura 6 bandas en aquellos carriles donde KLF1 está presente y no vemos nada donde se encuentra USP7 y Elo C solos.

Además, el tamaño obtenido de las bandas en la Figura 6 es el esperado, ~38 KDa (tamaño de KLF1)

7.4.2 Input con anticuerpo anti-flag

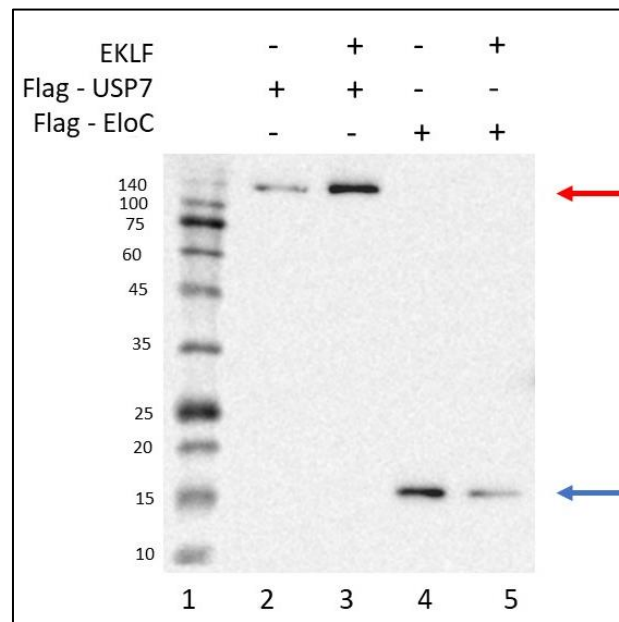


Figura 7. Análisis de la expresión de KLF1 en células eucariotas. Carriles: 1-Marcador de peso molecular, 2-USP7 (Flag-Tag), 3-KLF1 y USP7, 4-Elongin C (Flag-Tag), 5-KLF1 y Elo C. Las bandas que corresponden a elongin C están señaladas con una flecha azul (tamaño~15KDa). Las bandas que corresponden a USP7 están indicadas con una flecha roja (tamaño~128KDa).

El western blot que podemos ver en la Figura 7 está tratado con anticuerpos anti-flag, al igual que el de la Figura 5. Por este motivo, solo podemos observar en la membrana aquellas proteínas en las que el dominio flag esté presente en su estructura. Así, observamos bandas en los carriles 2 y 3 de la Figura 7 que se corresponden con USP7 (128 KDa) y en los carriles 4 y 5 de la Figura 7 que se corresponde con Elongin C (15 KDa).

7.4.3 Input con anticuerpo anti-GAPDH

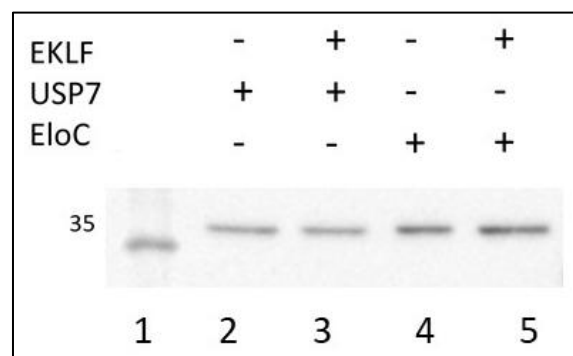


Figura 8. Gel control para todas las proteínas. Carriles: 1-Marcador de peso molecular, 2-USP7 (Flag-Tag), 3-KLF1 y USP7, 4-Elongin C (Flag-Tag), 5-KLF1 y elongin C.

Utilizamos la proteína GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) como control para confirmar que todos los extractos se han cargado correctamente en el gel. El GAPDH es un house-keeping. Las proteínas house-keeping presentan un carácter constitutivo ya que son necesarias para el mantenimiento de las funciones celulares basales, que son esenciales para la existencia de una célula, independientemente de su función específica en el tejido o el organismo. Por lo tanto, se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y fisiopatológicas, independientemente del tipo de tejido, la etapa de desarrollo, el estado del ciclo celular o la señal externa.

Basado en los resultados que podemos ver en la Figura 8, la carga en el gel se ha realizado correctamente.

7.5 Análisis mediante co-inmunoprecipitación de la interacción directa entre proteínas

Las *magnetic beads* cubiertas con anticuerpos anti-Flag tienen la capacidad de unirse a aquellas proteínas que tengan el dominio Flag, como Elo C o USP7. Así esperamos que durante la co-inmunoprecipitación ocurra lo que está representado en la Figura 9.

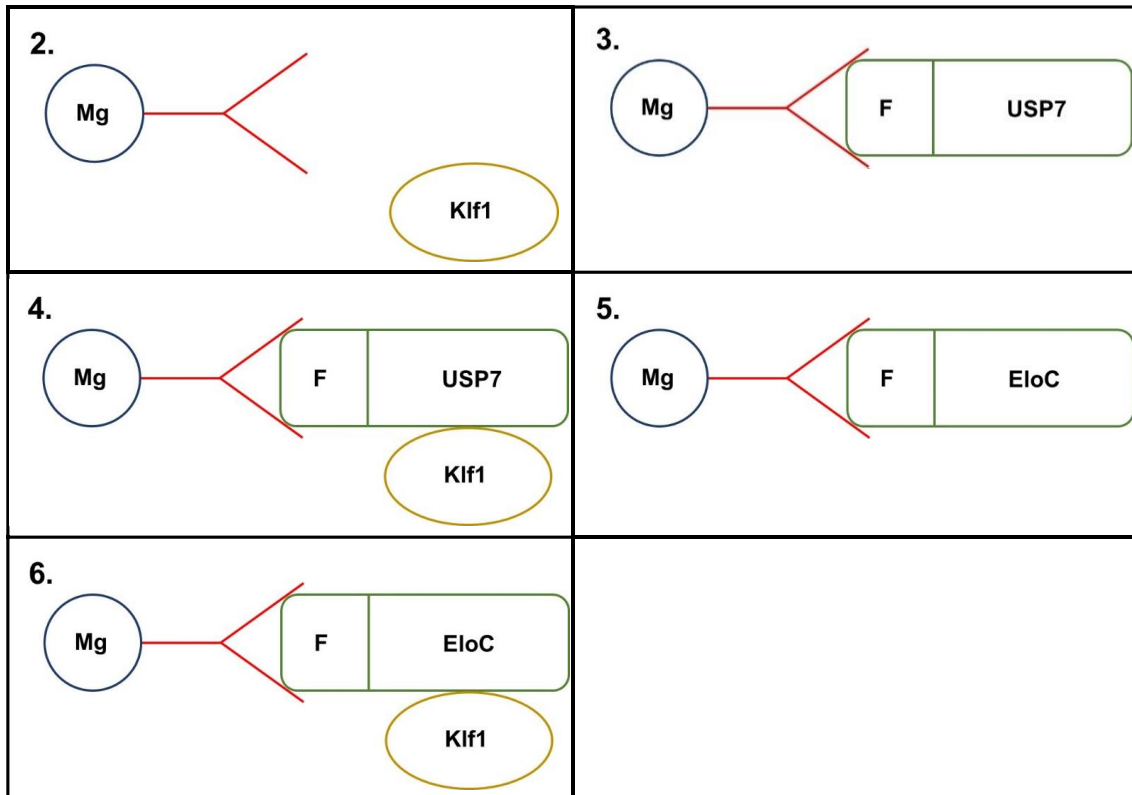


Figura 9. Esquema que representa todas las combinaciones de proteínas usadas durante la co-inmunoprecipitación y los resultados esperados.

Tras la co-inmunoprecipitación, realizamos un western blot esperando encontrar una banda correspondiente a la interacción en aquellas situaciones en las que sea posible.

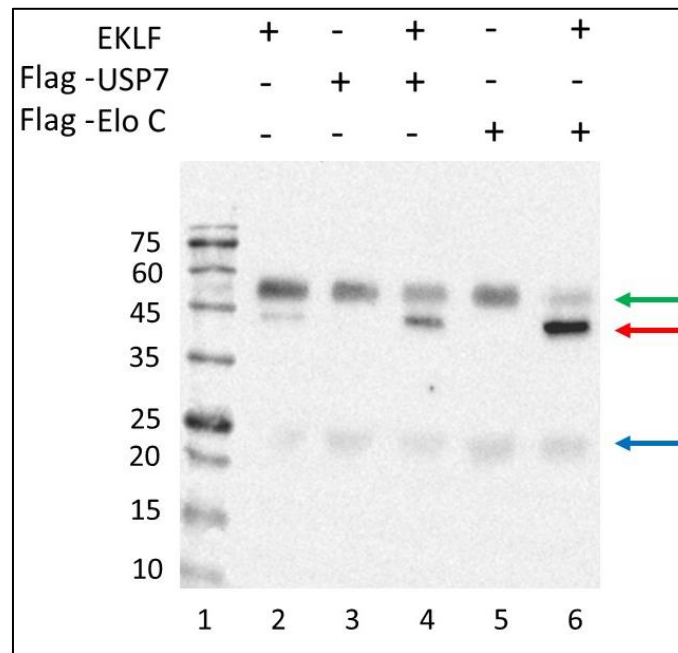


Figura 10. Análisis de las interacciones entre Elo C y KLF1 tras la inmunoprecipitación. Carriles: 1- Marcador de peso molecular, 2-KLF1, 3-USP7 (Flag-Tag), 4-USP7 y KLF1, 5-Elongin C (Flag-Tag), 6- Elo C y KLF1. Las cadenas fuertes del anticuerpo están señaladas con una flecha verde, las cadenas ligeras están señaladas con una flecha azul. La interacción de KLF1 y Elo C está señalada con una flecha roja.

Viendo la Figura 10 podemos confirmar nuestra hipótesis: hay interacción entre KLF1 y Elo C. Esto lo deducimos porque en el carril número 6 de la Figura 10 podemos observar una banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 38KDa (tamaño de KLF1) que tiene que corresponderse a la interacción ya que solo podemos ver la proteína KLF1 si esta se encuentra presente en la membrana por interacción con Elo C (carril 6 de la Figura 10) o con USP7 (carril 4 de la Figura 10) ya que KLF1 no tiene la capacidad de unirse al anticuerpo anti-Flag durante la co-inmunoprecipitación. Por lo tanto, esta banda está formada por el tratamiento conjunto de la co-inmunoprecipitación (con anticuerpos anti-flag) y la incubación en el western blot con el anticuerpo 7b2 (anti-KLF1), que nos permite ver a KLF1. Como era de esperar, también podemos observar la banda de interacción en el carril número 4 de la Figura 10, en el que se encontraba el control positivo USP7. Además, con las flechas verde y azul se indican las cadenas pesadas y las cadenas ligeras respectivamente.

Por otro lado, en el carril número 2 de la Figura 10 no deberíamos observar la banda correspondiente a la interacción ya que KLF1 no posee el dominio Flag y no está junto con Elo C o USP7. Este resultado erróneo podría deberse a una interacción

inespecífica entre las *magnetic beads* y KLF1, que fuese independiente de los anticuerpos (Figura 11). Sin embargo, la fuerza de la banda es claramente diferente entre los carriles 2 y 6 de la Figura 10 lo que demuestra que la banda del carril 6 de la Figura 10 se produce por una interacción real.

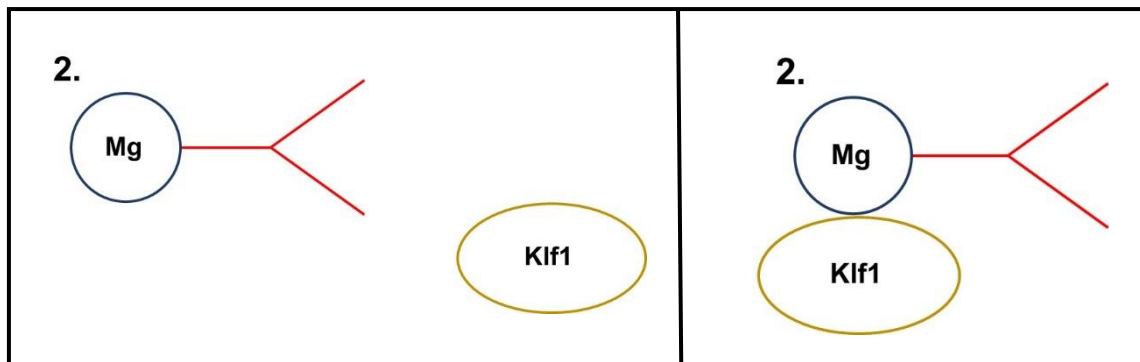


Figura 11. Esquema que muestra la posibilidad de que la proteína KLF1 esté estableciendo una interacción inespecífica directamente con las magnetic beads.

Basándonos en los resultados podemos afirmar que KLF1 interactúa directamente con elongin C. Por lo tanto, tenemos una nueva interacción proteína-proteína que debe ser considerada en la regulación de la actividad de KLF1.

A partir de este momento, el estudio debe orientarse a conocer cómo se produce esta interacción, si existe alguna otra proteína que afecte a esta asociación y cómo afecta al funcionamiento de KLF1. Para ello, también es importante tener un amplio conocimiento de la estructura y el funcionamiento de elongin C.

Aparte de eso, sabemos que el KLF1 es un factor de transcripción que está involucrado en el proceso de transcripción que consiste en 3 pasos principales.

1. Iniciación
2. Alargamiento
3. Terminación

Con nuestro conocimiento actual sobre la elongin C podemos suponer que esta proteína podría desempeñar un papel en el paso de la elongación, ya que su función está relacionada con la RNA polimerasa II. Además, forma un complejo con la elongin B, siendo el complejo BC regulado por la elongin A. Esto indicaría que la interacción con KLF1 ocurre dentro de múltiples complejos de subunidades que deben ser analizados más a fondo en futuras líneas de investigación.

8. Conclusiones

Durante este trabajo experimental se ha tratado de comprobar la existencia de una interacción directa proteína-proteína entre KLF1 y Elo C.

Paso a paso hemos ido comprobando los supuestos en los que nos hemos basado para responder a nuestra hipótesis principal. Para ello, aislamos el ADN de interés a partir de células competentes, verificamos la expresión de Elo C en nuestras células eucariotas escogidas (cos-7) y, por último, hicimos un inmuno-blot para estudiar esta interacción.

Tras obtener los datos finales, podemos concluir que sí existe interacción directa entre KLF1 y Elo C, estos datos los obtenemos de la co-inmunoprecipitación llevada a cabo con controles tanto positivos como negativos y con el uso de los anticuerpos idóneos.

9. Conclusions

During the research project we tried to verify if there is a direct protein-protein interaction between KLF1 and Elo C.

We have based ourselves on some assumptions to elaborate the experiment. Throughout the study we have tested this series of assumptions. To do this, we isolated our interested DNA from competent cells, verified the expression of Elo C in eukaryotic cells (cos-7) and finally we made an immuno-blot to study this interaction.

After obtaining the final data, we can conclude that there is a direct interaction between KLF1 and Elo C, these data are obtained from the co-immunoprecipitation carried out with both positive and negative controls and with the use of suitable antibodies.

10. Bibliografía

1. Quadrini KJ, Bieker JJ. EKLF/KLF1 is ubiquitinated in vivo and its stability is regulated by activation domain sequences through the 26S proteasome. *FEBS Lett.* 2006;
2. Siatecka M, Bieker JJ. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood* [Internet]. 2011 Aug 25;118(8):2044–54. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-03-331371>
3. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1993 May;13(5):2776–86. Available from: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.13.5.2776>
4. Fan Y, Lu H, Liang W, Hu W, Zhang J, Chen YE. Krüppel-like factors and vascular wall homeostasis. *J Mol Cell Biol* [Internet]. 2017 Oct 1;9(5):352–63. Available from: <https://academic.oup.com/jmcb/article/9/5/352/4092938>
5. Yien YY, Bieker JJ. EKLF/KLF1, a Tissue-Restricted Integrator of Transcriptional Control, Chromatin Remodeling, and Lineage Determination. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Jan 1;33(1):4–13. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01058-12>
6. Chen X, Bieker JJ. Unanticipated Repression Function Linked to Erythroid Kruppel-Like Factor. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 May 1;21(9):3118–25. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.9.3118-3125.2001>
7. Sengupta T, Chen K, Milot E, Bieker JJ. Acetylation of EKLF Is Essential for Epigenetic Modification and Transcriptional Activation of the γ -Globin Locus. *Mol Cell Biol.* 2008;
8. Zhang W, Bieker JJ. Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;
9. Ouyang L, Chen X, Bieker JJ. Regulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain. *J Biol Chem.* 1998;
10. Siatecka M, Xue L, Bieker JJ. Sumoylation of EKLF Promotes Transcriptional Repression and Is Involved in Inhibition of Megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2007;
11. Kadam S. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* [Internet]. 2000 Oct 1;14(19):2441–51. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.828000>
12. Yien YY, Bieker JJ. Functional interactions between erythroid kruppel-like factor (EKLF/KLF1) and protein phosphatase PPM1B/PP2C β . *J Biol Chem.* 2012;
13. Soni S, Pchelintsev N, Adams PD, Bieker JJ. Transcription factor EKLF (KLF1) recruitment of the histone chaperone HIRA is essential for β -globin gene expression. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Sep 16;111(37):13337–42. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1405422111>
14. Siatecka M, Soni S, Planutis A, Bieker JJ. Transcriptional Activity of Erythroid Kruppel-like Factor (EKLF/KLF1) Modulated by PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3). *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Apr 10;290(15):9929–40. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.610246>
15. Rougeot J, Renard M, Randsholt NB, Peronnet F, Mouchel-Vielh E. The Elongin Complex Antagonizes the Chromatin Factor Corto for Vein versus Intervein Cell

- Identity in *Drosophila* Wings. PLoS One. 2013 Oct 21;8(10).
16. Bradsher JN, Jackson KW, Conaway RC, Conaway JW. RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. J Biol Chem. 1993;
 17. Chen S, Jang GM, Hüttenhain R, Gordon DE, Du D, Newton BW, et al. CRL4 AMBRA1 targets Elongin C for ubiquitination and degradation to modulate CRL5 signaling . EMBO J. 2018;
 18. Beringer M, Pisano P, Di Carlo V, Blanco E, Chammas P, Vizán P, et al. EPOP Functionally Links Elongin and Polycomb in Pluripotent Stem Cells. Mol Cell. 2016;