



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

Caracterización de las corrientes iónicas inducidas en ovocitos
de *Xenopus leavis* inyectados con mRNA de células
epiteliales (MDCK)

T E S I S

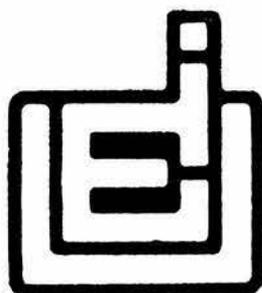
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JESUS VEGA HERRERA

TUTOR: ARTURO PONCE BALDERAS



LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Caracterización de las corrientes iónicas inducidas en ovocitos de *Xenopus laevis*
inyectados con RNA mensajero de células epiteliales (MDCK)**

PROLOGO

Los epitelios discriminan entre dos medios biológicos de distinta composición, como la orina o la sangre, gracias a que las células que los constituyen tienen dos propiedades fundamentales: la primera es que forman uniones con sus vecinas y la segunda es que polarizan su membrana en un dominio apical y uno basolateral. Ambos dominios tienen diferencias marcadas, tanto a nivel morfológico, como en el de la composición de los lípidos y proteínas que constituyen a la membrana. La diversidad de componentes de membrana como son los transportadores, acarreadores y canales iónicos también es distinta entre ambas caras.

Un problema biológico particularmente interesante es saber cómo hace una célula epitelial para reconocer, dirigir y ubicar adecuadamente las proteínas que habrán de incorporarse hacia uno u otro dominio de la membrana. Puesto que las proteínas siguen inicialmente una vía común de síntesis, que va desde la transcripción del DNA a RNA mensajero en el núcleo, y de ahí su traducción a secuencias peptídicas en el retículo endoplasmico que después maduran y son glicosiladas en el aparato de Golgi. Actualmente se sabe poco acerca de cómo las células reconocen y ubican polarizadamente sus proteínas de membrana. La mayor parte de información se ha obtenido desarrollando anticuerpos que reconocen proteínas de membrana, que si bien se ha demostrado que se encuentran distribuidas polarizadamente, se desconoce cual es su papel fisiológico.

Una alternativa es utilizar a los canales iónicos como marcadores de polarización, pues representa dos ventajas: (1) son proteínas de membrana cuya función es conocida, propiamente la de permitir el paso de iones de una a otra cara de la membrana, (2) la sensibilidad de las técnicas electrofisiológicas actuales, como el "patch clamp", permiten distinguir la presencia de una sola de estas proteínas en la membrana.

Se han encontrado canales iónicos en las células epiteliales, que como otras proteínas de membrana siguen una distribución polarizada, por ejemplo los canales de Na^+ sensibles a amilorida están localizados en las microvellosidades de la cara apical en epitelio intestinal, mientras que en las células MDCK se han descrito distintos tipos de canales de K^+ , algunos de los cuales se encuentran solo en la cara apical o basolateral. De esta manera el interés general del tema de trabajo en el laboratorio al cual me he incorporado es el estudio del fenómeno biológico de la polarización de proteínas de membrana en células epiteliales, pero la intención es enfocarlo con el estudio de los canales iónicos.

Para dicho propósito en nuestro laboratorio se han utilizado como modelo biológico a las células MDCK (Madin Darby Canine Kidney Cells), una línea derivada de riñón de perro. Estas células en cultivo forman uniones oclusoras con sus vecinas y polarizan su membrana en un dominio apical y uno basolateral, formando así monocapas. En trabajos previos se ha demostrado, utilizando la técnica de "patch clamp", que estas células tienen cinco tipos de canales selectivos a K^+ y un tipo a Cl^- , también se pudo comprobar que estos canales están distribuidos polarizadamente: cuatro tipos de canales selectivos al K^+ se encuentran sólo en la cara apical, mientras que el resto lo hace sólo en la basolateral. Con estos antecedentes, sabemos que los canales iónicos en las MDCK constituyen un modelo adecuado para estudiar el problema de la distribución polarizada de proteínas de membrana.

Es muy probable que las proteínas tengan una señal que las identifique, ya sea como basolaterales o apicales,

y que exista un mecanismo celular capaz de reconocer dicha secuencia. Nuestro interés principal es estudiar precisamente esas señales. El enfoque consiste en identificar las secuencias de los mensajeros que codifican para los canales apicales y basolaterales y compararlas, buscando una secuencia que sea común a los apicales y que no tengan lo basolaterales, o viceversa. Para esto es preciso primeramente aislar, clonar y secuenciar los genes que codifican para los distintos canales de potasio en las MDCK.

Dentro de las metodologías utilizadas para la clonación de genes que codifican para canales iónicos se encuentra la llamada **clonación por expresión**, que consiste en la inyección de RNA mensajero total de las células de interés a ovocitos de *Xenopus laevis*, registrando las corrientes iónicas inducidas y corroborando la selectividad de los canales expresados, fraccionando posteriormente el mRNA y haciendo bancos de expresión de cDNA hasta encontrar las clonas que específicamente codifiquen para los canales iónicos.

El propósito de mi trabajo consiste entonces en poner a punto la metodología de expresión en ovocitos de *Xenopus*, así como aislar los mRNAs de las MDCK 6 horas después de ser sembradas, tiempo en el cual se ha demostrado que se induce la expresión de los canales de K^+ y, utilizando posteriormente este sistema de traducción *in vivo*, caracterizar las corrientes expresadas como un paso previo a la clonación de los canales expresados.

Por lo anterior, he organizado esta tesis en 5 capítulos: En el primero hago una síntesis de los conocimientos actuales sobre los canales iónicos en general, así como una breve revisión de la estructura de los canales iónicos, con énfasis en los canales de K^+ y Cl^- , debido a que estos son los tipos de canales predominantes en las células MDCK. Presento también un resumen sobre las características de la polaridad epitelial, así como del modelo experimental utilizado en este trabajo. En el segundo capítulo presento los objetivos a realizar y en el tercero la metodología utilizada en esta tesis. En el cuarto describo los resultados obtenidos, mientras que en el quinto elaboro una discusión comparando mis resultados con trabajos reportados por otros autores. En el sexto y último capítulo presento las conclusiones emanadas de mi trabajo.

ABREVIATURAS:

ATP	Adenosin Trifosfato
CDMEM	Medio esencial mínimo modificado de Dullbecco
cDNA	DNA complementario
cRNA	RNA complementario
DEPC	Diethylpirocarbonato
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DNA	Acido Desoxi-ribonucleico
EDTA	Acido etilendiamintetraacetico
I-V	Relación entre el potencial de membrana y la corriente registrada
MBS	Medio salino modificado de Barth
MDCK	Células epiteliales Madin Darby Canine Kidney
MetSO4	Metanosulfonato
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial Hidrógeno
PI	Fosfatidil Inositol
TEA	Tetraetilamonio
TTX	Tetrodotoxina
UO	Unión Oclusora
4-AP	4-Amino piridina

CONTENIDO

I INTRODUCCION	1
1.1 Canales ionicos	1
1.1.1 Propiedades de los canales iónicos	2
1.1.2 Estructura de los canales iónicos	4
1.2 Polarizacion apical/basolateral	12
1.2.1 Distribución polarizada de la membrana plasmática y sus elementos	12
1.2.2 Direccionamiento polarizado de proteínas	14
1.2.3 Señales de identidad en las proteínas apicales y basolaterales	14
1.3 Modelo experimental	15
1.3.1 Distribución polarizada de canales iónicos en células MDCK	16
1.3.2 Reducción de la magnitud de las corrientes de K ⁺ y de la superficie membranal mediante el tratamiento de células MDCK con tripsina-EDTA	16
1.3.3 Restauración de las corrientes de K ⁺ y de la superficie membranal en células recién sembradas	17
1.3.4 Estrategia experimental	18
II OBJETIVOS	21
III MATERIAL Y METODOS	22
3.1 Obtención y mantenimiento de <i>Xenopus laevis</i>	22
3.2 Aislamiento de ovocitos	23
3.3 Transcripción <i>in vitro</i> de los cDNA de canales de potasio clonados (ShA2, drosófila, y RCK1, rata)	23
3.3.1 Aislamiento de plásmidos	23
3.3.2 Electroforesis de DNA (minigel de agarosa al 1%)	24
3.3.3 Restricción de los plásmidos que contienen los canales de potasio clonados	24
3.3.4 Transcripción <i>in vitro</i>	25
3.4 Cultivo de células MDCK	25
3.5 Aislamiento de RNA total de células en monocapa	25
3.6 Purificación de mRNA poli (A) ⁺ por poli(U)-sepharosa	26
3.6.1 Electroforesis de RNA	27
3.6.2 Desnaturalización del RNA	27
3.7 Fraccionamiento de mRNA por centrifugación en gradiente de sacarosa	27
3.8 Microinyección	28
3.9 Sistema de estímulo y registro de las corrientes iónicas expresadas <i>in ovo</i>	28

IV RESULTADOS	34
4.1 Sistema de expresión en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	34
4.1.1 Expresión de canales clonados	34
4.2 Corrientes inducidas por mRNA poli(A) ⁺ de células MDCK	38
4.2.1 La corriente expresada es una corriente de K ⁺	40
4.2.2 Farmacología de la corriente expresada	42
4.2.3 Determinación de los mRNA que inducen las corrientes de K ⁺	42
V DISCUSION	47
VI CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53

INDICE DE FIGURAS

1.- Corrientes tipo A de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
2.- Corrientes de potasio en ovocitos de <i>Xenopus</i> inyectados con mRNAs de diferentes subfamilias de canales tipo <i>Shaker</i>	5
3.- Modelo estructural de los canales tipo <i>Shaker</i>	6
4.- Estructura de los canales de potasio I_{SK} y de los canales de K^+ rectificadores entrantes	8
5.- Estructura molecular de los canales de Na^+ y Ca^{2+}	9
6.- Subunidades de los canales de Ca^{2+}	10
7.- Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR)	11
8.- Estructura molecular del canal de cloro de la electroplaca de <i>Torpedo</i>	11
9.- Representación esquemática de la polarización de las células epiteliales	13
10.- Corrientes capacitivas e iónicas de células MDCK en monocapas maduras y recién sembradas	17
11.- Efecto de drogas inhibitorias de procesos celulares sobre la recuperación de membrana y de conductancia al potasio en células MDCK	18
12.- Obtención de ovocitos	22
13.- Sistema de estímulo y registro de las corrientes	29
14.- Representación esquemática de los plásmidos conteniendo los genes <i>ShA2</i> y <i>RCK1</i>	34
15.- Corrientes tipo A en ovocitos inyectados con mRNA del gen <i>ShA2</i>	36
16.- Corrientes tipo rectificador tardío en ovocitos inyectados con mRNA del gen <i>RCK1</i>	36
17.- Curva I•V de las corrientes de K^+ inducidas por el mRNA de los canales <i>ShA2</i> y <i>RCK1</i>	37
18.- Amplitud de las corrientes obtenidas en ovocitos inyectados con mRNA poli (A) ⁺ y ovocitos control	38
19.- Patrones de corriente expresadas en ovocitos inyectados con mRNA poli (A) ⁺ de células MDCK	39
20.- Curva I•V de corrientes en ovocitos inyectados con mRNA poli (A) ⁺ con y sin $MetSO_4$	40
21.- Efecto del cambio en las concentraciones de K^+ sobre los potenciales de inversión de las corrientes expresadas	41
22.- Valores de los potenciales de inversión a diferentes concentraciones de K^+	42
23.- Efecto del TEA sobre las corrientes expresadas	43
24.- Efecto de la 4-AP sobre las corrientes tipo III expresadas en ovocitos inyectados con mRNA de células MDCK	44
25.- Curva I•V de las corrientes tipo I,II y III con y sin 4-AP	
26.- Corrientes de K^+ inducidas por mRNAs de células MDCK separados por peso molecular en gradientes de sacarosa	45

I. INTRODUCCIÓN

I.1 CANALES IONICOS

El movimiento de iones a través de las membranas biológicas se realiza a través de dos tipos de proteínas integrales: los acarreadores y los canales iónicos. El primer tipo de proteínas incluye a la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, la bomba de Ca^{2+} , la bomba de H^+ , y el intercambiador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$. Este tipo de entidades moleculares transportan iones con un flujo del orden de mil millones en un segundo y requieren energía para su funcionamiento. Los canales iónicos forman, bajo ciertas circunstancias, poros acuosos en la bicapa lipídica, permitiendo el paso selectivo de iones a favor de un potencial electroquímico (Hille, 1992)

La apertura de los canales iónicos modifica las propiedades eléctricas y termodinámicas de la membrana plasmática, reduciendo la barrera energética al flujo iónico transmembranal hasta valores cercanos a 5 kcal/mol (Eisen and Danni, 1987). Estas condiciones permiten altas velocidades de difusión del orden de un millón a cien millones de iones en un segundo (Cereijido *et al.*, 1988).

Se han encontrado diferentes tipos de canales iónicos en todos los *Fila* animales (Hille, 1992), Divisiones vegetales (Zeiger *et al.*, 1977; Schroeder *et al.*, 1984), protistas (Keller *et al.*, 1989), moneras (Moody and Bosma, 1989), y en la membrana de organelos intracelulares como cloroplastos (Althoff *et al.*, 1989) y mitocondrias (Sorgato *et al.*, 1987; Kinnally *et al.*, 1987; Henry *et al.*, 1989). Las funciones en las que participan los canales iónicos son tan diversas como la secreción (Kidokoro, 1975; Cota *et al.*, 1990), la regulación osmótica (Sackin, 1989), la transducción mecánica (Erxleben, 1989; Sachs, 1991), la fertilización (Tyler *et al.*, 1956; Darszon *et al.*, 1986; Simoncini and Moody, 1990), la producción de señales repetitivas en neuronas (Connor and Stevens, 1971b; Connor 1978), la proliferación celular (Deutsch, 1988), la diferenciación neural y la memoria (Ribera y Spitzer, 1992) entre otras.

Se han descrito una gran diversidad de canales. La mayoría son selectivos a alguno de los iones más importantes en biología (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), pero también existen canales que no distinguen entre los diversos cationes o aniones (Partridge and Swandulla, 1988). Para cada especie iónica se han descrito varios tipos de canales, y una célula dada puede tener varios tipos de canales selectivos para un mismo ión. Por ejemplo, Rae y Lewis (1984) describen al menos seis canales de K^+ diferentes en la misma membrana de una sola célula epitelial, mientras que Ponce y Cereijido (1991) encontraron cinco tipos distintos de canales de K^+ en las células MDCK.

Los canales, como la mayoría de los componentes membranales, no están estáticos en la membrana, sino que se renuevan continuamente. Su diversidad y abundancia depende del grado de diferenciación de la célula (Aguayo, 1989; Kubo, 1989), del ciclo celular (Block y Moody, 1989), o de la acción de agentes moduladores (Gunning, 1987; Levitan, 1988). Su distribución en la superficie de la membrana tampoco es homogénea. Por

ejemplo, se ha encontrado que en músculos esquelético reptilianos y murinos los canales de Na^+ se encuentran con mayor densidad en la placa terminal (Caldwell y Milton, 1987); mientras que en neuronas mielinizadas, los canales se encuentran con mucho mayor densidad en los espacios internodales, distribución asimétrica que se pierde cuando los axones son desmielinizados (Angelides, 1990; Dwivedy, 1990). En el caso de las células epiteliales, Brown y colaboradores (1989), utilizando marcadores específicos, encontraron que los canales de Na^+ sensibles a amilorida están localizados en las microvellosidades de la cara apical, mientras que Ponce y colaboradores (Ponce y Cereijido 1991; Ponce *et al.*, 1991a) han demostrado una distribución polarizada de canales iónicos de Cl^- y K^+ en las células MDCK.

La expresión de canales en una célula puede estar regulada por factores extracelulares (como contactos celulares a través de moléculas de adhesión celular (CAMs), Ca^{2+} , elementos de la matriz extracelular, etc. o bien puede ser regulada por factores intrínsecos de la célula. Por ejemplo, Moody y Bosma (1989) observaron que antes y después de la mitosis de los blastómeros de *Voltenia villosa*, un primitivo cordado marino, aparece y desaparece una conductancia al Cl^- , encontrando además que estos cambios cíclicos en dicha conductancia son controlados por un reloj biológico de las células.

1.1.1 Propiedades de los canales iónicos

Ante la creciente diversidad de canales descritos y la ausencia de una nomenclatura molecular, debido a la rapidez con que se han ido clonado o descrito nuevos tipos de canales, se ha vuelto cada vez más difícil clasificarlos. Latorre y Miller (1983) han propuesto agruparlos con base en sus propiedades funcionales, tales como:

1) *Sensibilidad*.- Los canales iónicos se pueden clasificar por el tipo de estímulo al que responden: si se abren o cierran debido a la unión de un ligando (como un neurotransmisor o un ión) a su receptor, se les denomina canales dependientes de ligando (véase la revisión de Levitan, 1988), si responden a estímulos mecánicos se denominan canales dependientes del estiramiento (Ver Sachs, 1991 para una revisión) y si operan por cambios en el voltaje transmembranal se llaman canales dependientes de voltaje (Cereijido *et al.*, 1987).

2) *Selectividad*.- La mayoría de los canales iónicos permiten el paso preferente de una sola especie iónica, dependiendo de la carga, tamaño y radio de hidratación del ión. Esta propiedad de los canales hace referencia entonces a la facilidad con que las diversas especies iónicas puede pasar a través de un canal iónico dado, y se debe a la preferencia o afinidad de los sitios de unión o grupos protéicos capaces de interactuar con los diferentes iones del entorno (Latorre y Miller, 1983). De esta forma, existen canales por los cuales el Na^+ puede pasar más fácilmente que el K^+ , y este a su vez más fácilmente que el Rb^+ , y este que el Li^+ , mientras que en otros tipos de canales, el K^+ puede pasar más fácilmente que otros cationes. Se dice entonces, por ejemplo, que un canal es de K^+ cuando este

ión permea más fácilmente que, por ejemplo el ión Na^+ u otros cationes. Esta propiedad es la más considerada en la nomenclatura actual de los canales iónicos.

3) *Conductancia.*- A pesar de ser igualmente selectivos para una especie iónica, los canales pueden diferir en su conductancia, la cual se define como la facilidad con la que un ión puede pasar a través de ellos cuando es impulsado por un gradiente electroquímico. Este parámetro se puede calcular a partir de la pendiente de la relación entre el potencial de membrana y la magnitud promedio de la corriente registrada. La conductancia de un solo canal se expresa en Siemens (S). La conductancia de un canal puede ser tan pequeña como 5 pS (Palmer y Frindt, 1986) o tan grande como 460 pS (Kolb *et al.*, 1985).

4) *Cinética.*- La cinética es un parámetro que hace referencia a los estados de apertura o cierre de los canales. El estudio de este parámetro se lleva a cabo al realizar análisis del curso temporal de la corriente iónica, la cual es proporcional a la conductancia bajo condiciones de fijación de voltaje. Estudiando corrientes a nivel macroscópico se pueden distinguir varios estados cinéticos: *activación*, la cual se observa como un incremento gradual en la conductancia hasta llegar a un estado estacionario, en respuesta a un cambio en el potencial de membrana; *desactivación*, que es el curso temporal de la conductancia cuando el potencial de fijación es regresado a su condición inicial e *inactivación*, que ocurre en algunos tipos de conductancias, como las de los canales de K^+ denominados *Shaker*, y se distingue por que las corrientes disminuyen con el tiempo aún cuando el potencial de fijación se mantiene constante .

5) *Farmacología.*- Para el estudio de canales iónicos se puede utilizar una sustancia de dos maneras: a) Ensayando el efecto de una droga de efecto desconocido sobre un canal que ya se ha caracterizado por otros medios (Siegelbaum *et al.*, 1982) ó b) Utilizando sustancias cuyos efectos son conocidos, pudiendosele usar para caracterizar un canal cuya naturaleza se ignora. Este tipo de sustancias pueden clasificarse en: i) *drogas que inhiben la actividad del canal:* como por ejemplo el tetraetilamonio (TEA) y la 4-AP, que bloquean los canales de K^+ activados por Ca^{2+} en células MDCK (Bolívar y Cerejido, 1987); el Ba^{2+} , el cual inhibe canales de K^+ rectificadores entrantes (Guy *et al.*, 1992); derivados de ácido indaniloxicético y antranílico, los cuales inhiben canales de Cl^- epiteliales (Landry *et al.*, 1987). ii) *Toxinas:* tales como la tetrodotoxina (TTX), veneno extraído de *Tetrarodon fugu* o botete, el cual bloquea canales de Na^+ de células excitables (Hartshorne *et al.*, 1985) o la apamina, veneno de abeja que bloquea específicamente una clase de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Romey *et al.*, 1984).

6) *Modulación.*- Los canales iónicos son susceptibles de ser modulados ya sea por mecanismos intrínsecos a la célula o bien a mecanismos debidos a la inducción por mensajeros extracelulares. Por ejemplo, la proteína cinasa C, al ser inducida su acción fosforilante con ésteres de forbol o diacilgliceroles, decrece las corrientes de K^+ (Baraban *et*

al, 1985; Malenka *et al.*, 1986), las corrientes de Cl^- (Madison *et al.*, 1986) y las corrientes de Ca^{2+} (Rane y Dunlap, 1986).

1.1.2 Estructura de los canales iónicos

A pesar de los grandes progresos logrados en el estudio de la función de los canales con el uso de técnicas electrofisiológicas, la naturaleza química y la estructura molecular de los canales iónicos permanecieron como una incógnita por mucho tiempo. Solo muy recientemente, con el uso de métodos bioquímicos y farmacológicos, se demostró que los canales iónicos son proteínas embebidas en la matriz lipídica, que forman un poro acuoso por el cual pueden pasar los iones (Catterall *et al.*, 1979; Agnew, 1984; Barchi, 1986). La reciente introducción de técnicas de biología molecular ha permitido un gran avance, pues con ellas ha sido posible aislar mRNAs que codifican para canales iónicos, y deducir a partir de la secuencia de aminoácidos la estructura de algunos canales.

1) *Canales de K^+* .- Los canales de K^+ voltaje dependientes pertenecen a la superfamilia de canales dependientes de voltaje, los cuales incluyen a los canales de Na^+ y Ca^{2+} (Catterall, 1988), a la de los canales catiónicos dependientes de segundos mensajeros (Jan and Jan, 1990), canales activados por nucleótidos cíclicos (Kaupp *et al.*, 1989) y los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (*Slo*) (Atkinson *et al.*, 1991). Debido a que no existen ligandos de alta afinidad para los canales de K^+ , como los existentes para los canales de Ca^{2+} o Na^+ , su estructura primaria no se conoció sino hasta que se desentrañó el comportamiento de las mutantes *Shaker* (*Sh*) de *Drosophila melanogaster*, las cuales fueron reconocidas en el principio por su violenta forma de agitar los apéndices bajo anestesia por eter (Kaplan and Trout, 1969)(figura 1). Análisis con el método de fijación de voltaje de las corrientes de membrana en las fibras musculares de larvas de *Drosophila* tanto a nivel macroscópico como unitario, indicaron que las mutantes *Sh* tienen alterados canales de K^+ tipo A (I_A), un tipo

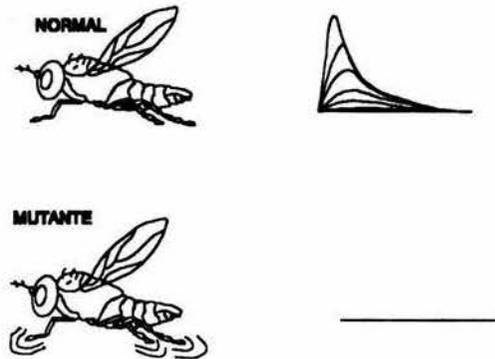


Figura 1. Los músculos de las moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* presentan un fenotipo de corrientes de potasio tipo I_A (arriba). Las mutantes *Shaker* de estas moscas deben su nombre a la agitación de sus extremidades cuando se les expone a eter (abajo). El estudio electrofisiológico de los músculos de estas mutantes mostró que la corriente I_A no se encuentra presente, permitiendo suponer que los canales de potasio responsables de las corrientes I_A se encuentran mutados.

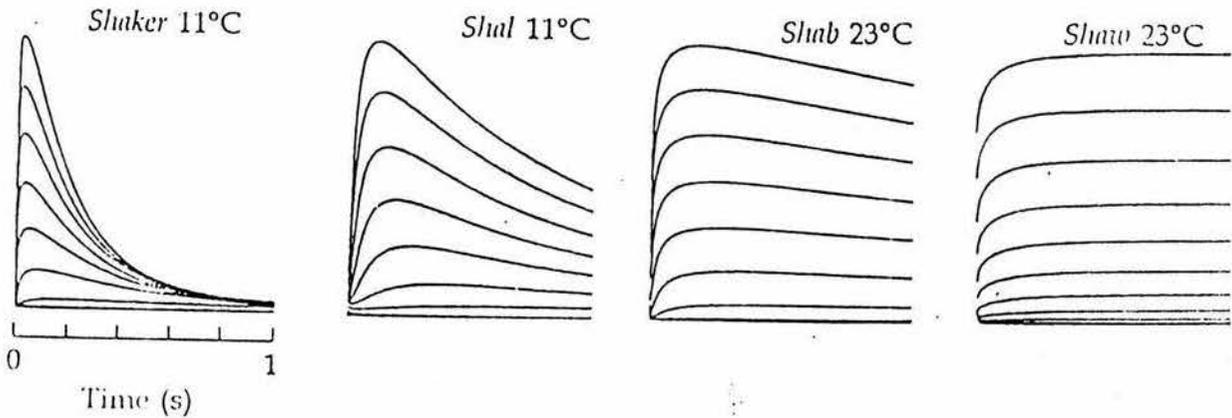


Figura 2.- Representación de los diferentes tipos de corrientes de potasio expresadas en ovocitos de *Xenopus* a los cuales se les inyectó con transcritos de cuatro genes de canales de potasio de *Drosophila* (*Shaker*, *Shal*, *Shab* y *Shaw*). Las corrientes fueron obtenidas al comandar pulsos depolarizantes de -80 a +20 mV a partir de un potencial de reposo de -80 mV. Los diferentes fenotipos de corrientes son registrados a distintas temperaturas debido a la diferencia en la velocidad de activación e inactivación de cada una de ellas. Tomado de Wei *et al.*, 1990.

de corriente que se inactiva rápidamente (Solck *et al.*, 1987; Wu and Haugland, 1989). Un extensivo análisis genético permitió mapear el locus *Sh* en la región 16F del cromosoma X de *Drosophila*. Este análisis fue la clave para la subsecuente identificación molecular del gene del canal de K^+ tipo *Sh*. Con la técnica del "chromosome walking", un mapeo físico del locus *Sh* fue construido y posteriormente alineado al mapa genético (Baumann *et al.*, 1987; Papazian *et al.*, 1987), aislándose subsecuente algunos cDNAs que podían estar correlacionados con el locus *Sh* (Kamb *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988), descubriéndose entonces que dichos cDNAs no codifican solo para una proteína que forma canales de K^+ sino para varias proteínas molecularmente muy relacionadas entre sí (Iverson *et al.*, 1988; Timpe *et al.*, 1988a, 1988b; Iverson and Rudy, 1990; Stocker *et al.*, 1990). El análisis molecular indicó que los cDNAs *Sh* se derivan a partir de una gran unidad de transcripción, de aproximadamente 150 kb de longitud, la cual contiene al menos 23 exones. Las vías de "splicing" y los sitios de inicio de transcripción alternativa permiten la síntesis de una gran cantidad de diferentes mRNAs que codifican para más de 10 subunidades diferentes de canales de K^+ . El análisis de estas proteínas a permitido agruparlas en subfamilias funcionales diferentes: *Shab*, *Shal*, *Shaw*, (Christie *et al.*, 1989). Estudios recientes utilizando dendrotoxina (DTX), han permitido estudiar la composición protéica de estos canales (Scott *et al.*, 1990). El receptor a DTX purificado consiste de dos subunidades: la subunidad α (correspondiente a las subunidades clonadas), y la subunidad β cuya secuencia y función son a la fecha desconocidas. Cada subunidad α de cada subfamilia se ensambla en un canal de K^+

homomérico con una estequiometría probable de 4 subunidades (Mackinnon, 1991) en el sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus*, dando origen a canales con diferentes propiedades. La mayoría de los canales que han sido clonados presentan una inactivación lenta, tipo rectificador tardío (Shaw o Shab en la figura 2). En contraste, los canales de K^+ con inactivación rápida (tipo A) son menos abundantes, ya que solo 4 clonas de cDNA (RCK4, *RShal*, Raw3 y *RKShIIID*) de los 25 canales tipo *Sh* conocidos a la fecha presentan dicha cinética (Stühmer *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1991; Retting *et al.*, 1992; Vega-Saenz *et al.*, 1991).

A pesar de la variada composición de exones y la gran diversidad de canales tipo *Sh*, todos ellos presentan ciertas características estructurales que les son afines (figura 3): Seis secuencias hidrofóbicas (S1-S6), también denominada región núcleo, a lo largo de la cadena polipeptídica, las cuales atraviesan la membrana en forma de una α hélice, existiendo un alto grado de conservación entre los canales en los seis dominios, particularmente el S6. La región núcleo se encuentra flanqueada por dominios hidrofílicos variables aminoterminales (NH_2) y carboxiloterminales (COOH-) ambos orientados intracelularmente. Al menos cinco diferentes regiones NH_2 terminales o COOH- terminales en estas proteínas han sido caracterizadas (Kamb *et al.*, 1988). Las regiones NH_2 terminales alternativas están involucradas en el ensamblaje de las subunidades (Ji *et al.*, 1992) así como en la inactivación tipo N (Hoshi *et al.*, 1990). Las regiones COOH- por su parte presentan sitios consenso de fosforilación por diversas proteínas cinasas, además de estar involucradas en la inactivación tipo C. La combinación de las regiones NH_2 y COOH- terminales alternativas determinan el modo de inactivación de los canales *Sh*. Se ha demostrado además que la región NH_2 terminal del canal *ShA* estimula la inactivación tipo N al actuar como una partícula de bloqueo, mecanismo al cual se le ha denominado como de "la bola y la cadena" (Hoshi *et al.*, 1990). Este mecanismo sugiere que la bola de inactivación formada por la región NH_2 terminal se coloca en la boca interna del canal, bloqueando al canal desde su interior. La inactivación tipo N es sensible a TEA (un bloqueador selectivo de canales de K^+) cuando esta se aplica internamente. La inactivación tipo C probablemente permite que la boca

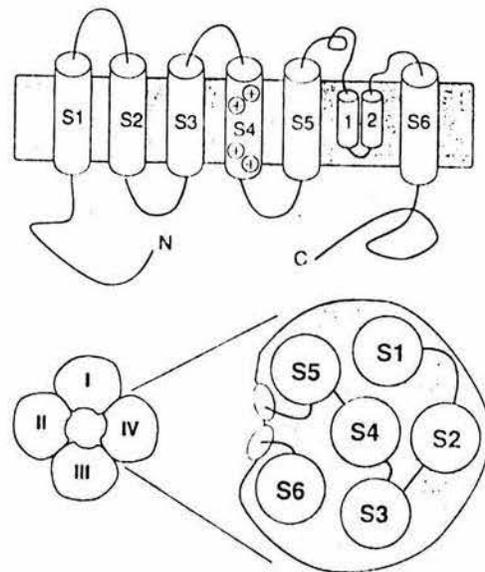


Figura 3.- (A) Modelo estructural de los canales de potasio tipo Shaker. Estos canales presentan seis segmentos hidrofóbicos cada uno con aproximadamente 20 aminoácidos los cuales cruzan la membrana en forma de una alfa hélice. El segmento S4 forma el sensor a voltaje debido a que presenta residuos cargados positivamente cada tercer aminoácido. El segmento S5 se encuentra formado por dos porciones denominadas 1 y 2, hallándose en la primera el segmento P o formador del poro. (B) Cada subunidad se ensambla en un homotetrámero o un heterotetrámero los cuales forman el canal funcional, en cuyo centro se encuentran orientados los COO- o NH_2 terminales de cada subunidad formando el poro.

externa del canal se cierre. La inactivación lenta es sensible a TEA por la parte interna, pero también se ve afectada por la presencia de TEA por la parte externa.

El dominio hidrofóbico S4 se encuentra altamente conservado entre una gran cantidad de canales dependientes de voltaje, como los *Sh* o los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , los canales de Ca^{2+} y de Na^+ . Este segmento contiene aminoácidos cargados positivamente (arginina o lisina) exhibiendo un patrón general: $(Arg/Lys-X-X)_n$, en donde n varía entre 4 y 7. El cambio de estos aminoácidos, utilizando mutagénesis dirigida, cambia la dependencia al voltaje de estos canales (Papazian *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que la secuencia S4 juega un papel muy importante en el cambio conformacional que acompaña a la activación del canal, quizá debido a las interacciones entre los residuos cargados positivamente y el campo eléctrico de la membrana estimulada.

La región H5 es un dominio hidrofóbico altamente conservado entre los canales de K^+ que une los segmentos S5 y S6, la cual atraviesa la membrana parcialmente para después volver a salir (Atkinson *et al.*, 1991; Durrell and Guy, 1992). Estas características han permitido sugerir que este dominio juega un papel clave en la selectividad al potasio de estos canales. En el dominio H5 se encuentra una secuencia de 17 aminoácidos denominada segmento P (formador del poro), el cual constituye la vía de conducción de iones del canal (Mackinnon and Yellen, 1990). Utilizando mutagénesis *in vitro* se ha demostrado que el cambio de solo 3 aminoácidos elimina la actividad del canal o su farmacología. Este segmento también se encuentra en canales rectificadores entrantes, los cuales son independientes del voltaje, lo que ha permitido especular que esta región debió de aparecer en un gen ancestral antes de la divergencia entre los canales de K^+ dependientes de voltaje y los rectificadores entrantes (Ho *et al.*, 1993).

Una gran cantidad de canales de K^+ que han sido clonados a partir de tejidos de mamíferos tienen su contraparte en las cuatro subfamilias de genes de *Drosophila* (Jan and Jan, 1992), pero a diferencia de estos, los canales de vertebrados son generalmente productos de exones únicos e ininterrumpidos (Chandy *et al.*, 1990). Las subfamilias de *Drosophila* y las de vertebrados comparten un 52-82% de homología, esto ha permitido especular que las cuatro subfamilias aparecieron antes de la divergencia entre protostomados y deuterostomados (Wei *et al.*, 1990). Lo que es más, el reciente descubrimiento de genes homólogos en la primitiva planta *Arabidopsis thaliana* (Anderson, 1992) ha permitido especular que el hipotético gen ancestral de la familia *Shaker* debió de aparecer en la era Precámbrica, antes de la divergencia de los reinos *Plantae*, *Fungi* y *Animalia* (Jan and Jan, 1992)

Dos familias diferentes de canales de K^+ que no guardan semejanza alguna con la superfamilia *Shaker* han sido clonados mediante la técnica de clonación por expresión. Una de ellas es un canal de mamífero que presenta una activación muy lenta, del orden de minutos y virtualmente sin inactivación. Este canal ha sido denominado miniK o I_{K} (Takumi *et al.*, 1988). Este canal, a diferencia de todos los canales conocidos a la fecha, presenta solo 139 aminoácidos, los cuales atraviesan la membrana una sola vez. La porción NH_2 terminal se encuentra localizada en la región extracelular y el $COOH$ - terminal en la región intracelular (figura 4a). La segunda familia de canales que divergen de la familia *Sh* ha sido clonada muy recientemente y corresponde a la familia de los canales de K^+

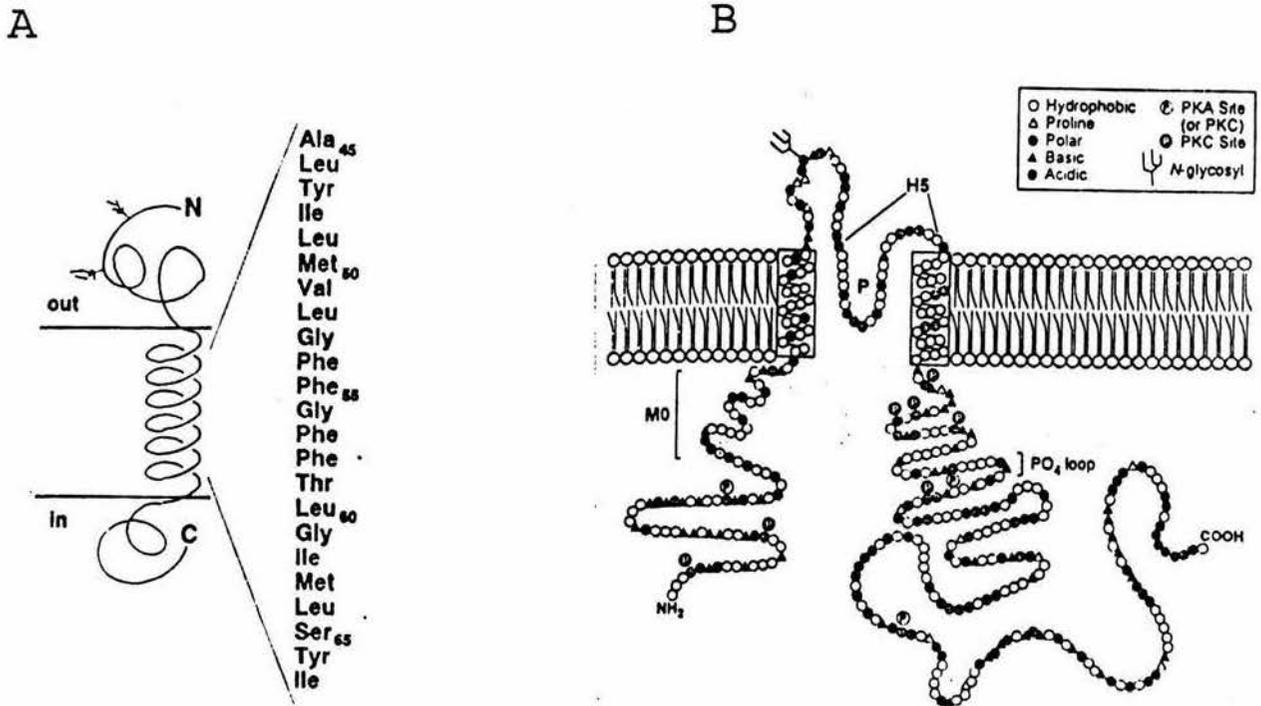


Figura 4. (A) Estructura del canal de potasio I_{Kx} . La proteína completa presenta solo 130 aminoácidos de los cuales 23 son transmembranales, así como dos sitios extracelulares susceptibles de N-glicosilación (Tomado de Takumi *et al.*, 1988). (B) Modelo estructural de los canales de potasio rectificadores entrantes. El segmento formador del poro del canal (P) se encuentra localizado en la región H5, la cual une los segmentos transmembranales M1 y M2. La región PO_4 es un sitio susceptible de fosforilación y de unión a ATP. Los símbolos representan distintos aminoácidos (Tomado de Ho *et al.*, 1993).

rectificadores entrantes o rectificadores anómalos, uno de ellos regulado por ATP (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993). La estructura molecular de estos canales (ROMK1 y IRK1) consiste de dos segmentos hidrofóbicos con grandes similitudes a los segmentos S5 y S6 de los canales de K^+ voltaje dependientes, así como de una secuencia entre estos dos segmentos que muestra una extensa similitud a la región H5 (figura 4b). Estas características han sugerido que la región H5 es la más conservada entre los canales de K^+ .

2) *Canales de Na^+* .- El aislamiento de los canales de sodio tuvo sus inicios cuando estuvieron a disposición drogas específicas para este tipo en particular de canales iónicos, como la TTX y la STX marcadas radiactivamente, ya que mediante técnicas bioquímicas permitieron identificar a sus receptores: los canales de sodio (Henderson and Wang, 1972). Cuando fue posible purificar completamente al canal se observó que está compuesto de una sola cadena

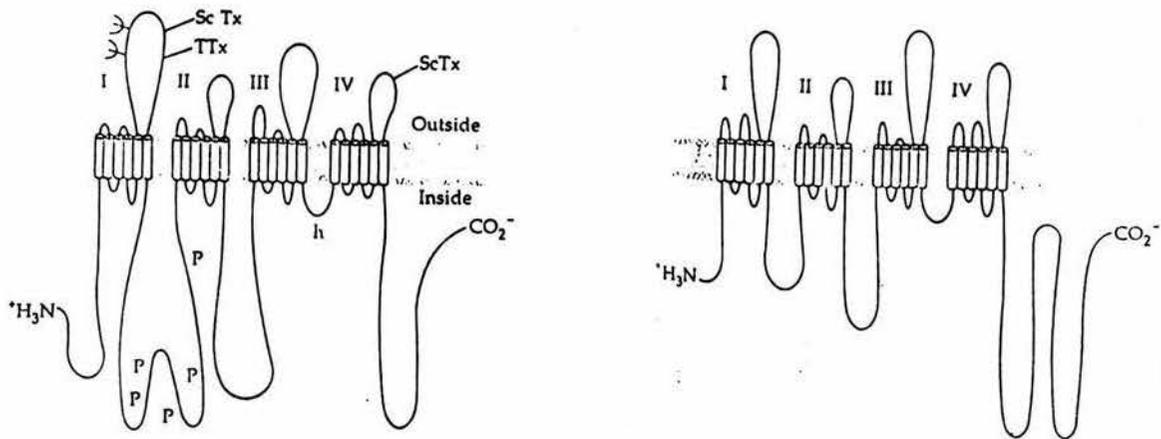


Figura 5. Estructura molecular de la subunidad α de los canales de Na^+ y Ca^{2+} . (A) Estructura de los canales de Na^+ , los repetidos internos se encuentran representados por los números I, II, III y IV. Algunas regiones se encuentran glicosiladas (ψ) o fosforiladas (p). Las regiones de unión a la toxina de escorpión (ScTx) o a la tetrodotoxina (TTX) también se encuentran indicadas. (B) Estructura de los canales de Ca^{2+} , los repetidos internos se encuentran indicados de igual forma que para los canales de Na^+ (Tomado de Catterall, 1988).

polipeptídica (~2000 aminoácidos) con un peso de 230 kDa, pero del cual el 30% de su peso corresponde a cadenas de azúcares unidos covalentemente y el 6% a ácidos grasos. El canal purificado incorporado a bicapas fosfolipídicas reconstituyó su sensibilidad al voltaje y a TTX (Catterall *et al.*, 1979; Agnew, 1984; Barchi, 1986).

Los canales de sodio están formados por un conjunto de subunidades (Barchi, 1988; Catterall, 1988; Trimmer and Agnew, 1989) de las cuales la subunidad α -el receptor a TTX- presenta la mayoría de las propiedades funcionales atribuidas al canal (formación del poro, sensibilidad al voltaje, etc). La introducción de técnicas de biología molecular permitió conocer más acerca de este canal y de la mayoría de los canales, pues con ellas ha sido posible aislar el mRNA que los codifica, y deducir a partir de él su secuencia de aminoácidos así como inferir su estructura molecular. El primer canal clonado fue precisamente el canal de Na^+ sensible a tetrodotoxina de la electroplaca de la anguila *Electrophorus electricus*, por Shosaku Numa y colaboradores. (Noda *et al.*, 1982, 1983, 1984, 1986). quienes, basándose en las características hidrofóbicas de los aminoácidos que constituyen la estructura primaria del canal de Na^+ , propusieron en 1984 un modelo consistente en cuatro unidades homólogas, cada una de ellas formada por una cadena de aminoácidos que atraviesa seis veces a la membrana (figura 5a).

3) *Canales de Ca^{2+}* .- Los primeros canales de Ca^{2+} aislados fueron los sensibles a dihidropiridinas (DHPs) de túbulos transversos de músculo esquelético de rata, utilizando nitrendipina tritiada como marcador (Curtis and Catterall, 1984). Con base a los procedimientos de purificación de los receptores a DHPs se propuso un modelo del canal de Ca^{2+} , que consiste en dos subunidades (α_1 y α_2) que junto con su zona de interacción forman el poro, interactuando de forma no covalente con otras tres subunidades (Catterall *et al.*, 1989); la figura 6 muestra un esquema de dicho modelo. La subunidad α_1 contiene los sitios de unión a los antagonistas a Ca^{2+} y sitios susceptibles de fosforilación dependiente de cAMP, y se ha propuesto que es el componente central que forma al canal. La subunidad β no interactúa con la membrana y probablemente está asociada con la parte intracelular de la subunidad α_1 . La subunidad γ interactúa de forma independiente con la subunidad α_1 . Las subunidades α_2 y δ forman un dímero que parece interactuar con la subunidad α_1 , el cual se ha relacionado con la actividad de unión a DHPs (Catterall *et al.*, 1989).

Numa y colaboradores lograron clonar a mediados de la década pasada algunos genes que codifican para canales de Ca^{2+} (revisado en Numa, 1989). La secuencia predicha de aminoácidos indicó que este tipo de canales son estructuralmente semejantes a los canales de Na^+ . La subunidad α de ambos canales presenta una estructura repetitiva: un motif de 300-400 aminoácidos repetido cuatro veces en los 1800+ aminoácidos de la cadena (figura 5b). Cada uno de estos cuatro *repetidos internos* incluye múltiples segmentos transmembranales, así como un segmento distintivo, el S4, que contiene aminoácidos cargados positivamente (arginina o lisina) cada tercer residuo.

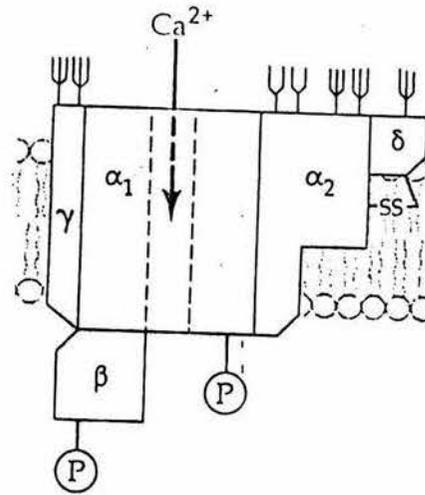


Figura 6 Subunidades de los canales de Ca^{2+} . ψ , región glicosilada, -SS-, puentes disulfuro, P, región fosforilada (Modificado de Catterall, 1988).

4) *Canales de Cl^-* .- La identificación y purificación de los canales de Cl^- ha tenido poco éxito debido a que no existen ligandos de alta afinidad. Los canales de Cl^- que han logrado clonarse pertenecen a diferentes clases estructurales: canales activados por ligando, canales activados por voltaje y canales que semejan a transportadores como el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) el cual es un canal de Cl^- formado por aproximadamente 1480 aminoácidos que forman una proteína con 12 dominios transmembranales y tres dominios citoplásmicos que presentan secuencias de fosforilación por proteínas cinasas reguladas por AMPc (Riordan

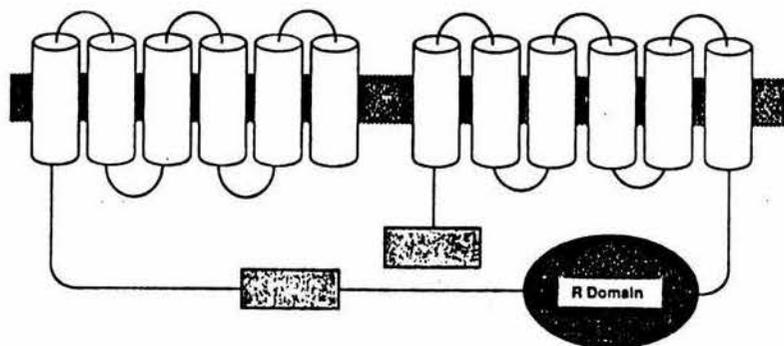


Figura 7. El regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) es un canal de cloro con dos regiones funcionales, cada una conteniendo seis dominios transmembranales y sitios de unión a ATP (representadas como cajas) así como una región altamente cargada, el dominio R, el cual contiene sitios susceptibles de fosforilación por proteína cinasa A (Tomado de Riordan *et al.*, 1989).

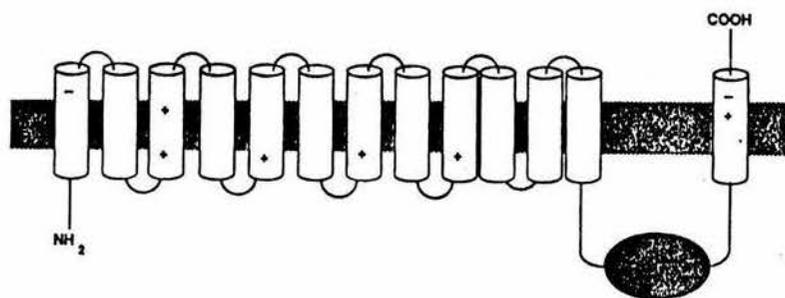


Figura 8. Estructura molecular del canal de cloro de la electroplaca de *Torpedo*. La región transmembranal entre los dominios 12 y 13 (representado en forma de elipse) contiene sitios de fosforilación por proteína cinasa A (tomado de Jentsch *et al.*, 1990).

et al., 1989). La figura 7 presenta una ilustración esquemática del CFTR. Algunos laboratorios intentaron clonar otros canales de Cl⁻ usando la técnica de PCR utilizando *primers* del gene de esta proteína sin resultado alguno, indicando que los canales de Cl⁻ podían formar una superfamilia diferente a las de canales de Ca²⁺, K⁺ o Na⁺. La clonación subsiguiente de otros genes para canales de Cl⁻, como el del canal de Cl⁻ de la electroplaca de *Torpedo marmorata*, y de otros canales derivados de diferentes tejidos, como riñón y cerebro de rata (CIC-O, CIC-1 y CIC-2) (Steinmayer, 1991; Thiemann *et al.*, 1992), así como de células MDCK (Paulmichl, 1992), y de otros tejidos comprobó dicha hipótesis (Jentsch *et al.*, 1990). La figura 8 presenta la estructura predicha para el canal de Cl⁻ de *Torpedo*.

1.2 POLARIZACION APICAL/BASOLATERAL

1.2.1 Distribución polarizada de la membrana plasmática y sus elementos.

La idea de que las células epiteliales presentan una permeabilidad diferente en la cara apical y la basolateral para un mismo tipo de ión, fue propuesta inicialmente por Koefoed-Johnson y Ussing (1958) para explicar el transporte vectorial de Na⁺ a través de la piel de rana. La existencia de este tipo de polarización se corroboró posteriormente en todos los epitelios capaces de transportar sustancias mediante el uso del microscopio electrónico, técnicas de fraccionamiento de membranas, adhesión diferencial de sondas radioactivas y/o fluorescentes, así como por otros procedimientos experimentales.

La membrana plasmática de las células epiteliales se encuentra dividida en dos grandes dominios: el apical que se orienta hacia el medio externo (luz) y el basolateral hacia el medio interno (intersticio), en la frontera entre ambos dominios se encuentra la unión oclusora (UO). Las características estructurales, bioquímicas y fisiológicas de la membrana apical difieren de aquellas de la membrana basolateral, esta propiedad permite el transporte vectorial de las distintas sustancias a través de estas células (figura 9). Las características anatómicas del dominio apical y basolateral de la membrana plasmática son diferentes. La cara apical se distingue por la presencia de microvellosidades y la basolateral por la presencia de desmosomas y uniones comunicantes. Ambas regiones difieren a su vez en sus áreas (Weibel, 1976; Matura *et al.*, 1982; Simons y Fuller 1985; Vega-Salas *et al.*, 1987) y en el número de partículas intramembranales por unidad de área (Galli *et al.*, 1976; Cereijido *et al.*, 1980).

Respecto a los componentes protéicos, se sabe que pueden exhibir diferentes formas de polarización en las membranas epiteliales:

a) *Polaridad opuesta en la membrana de una misma célula.* Por ejemplo, la Na-K-ATPasa (Lamb *et al.*, 1981; Cereijido *et al.*, 1980, 1981), la aminopeptidasa (Louvard, 1980), la adenilato ciclasa (Reik *et al.*, 1970), los receptores a hormonas (Parr y Kirby, 1979; Taylor *et al.*, 1982), los sistemas de transporte de iones y aminoácidos

(Gmaj *et al.*, 1979; Aiton *et al.* 1982; Rabito *et al.*, 1982), canales de K^+ y Cl^- (Ponce *et al.*, 1991a) y los de monosacáridos (Kinne *et al.*, 1975; Rabito y Ausiello 1980), así como proteínas de uniones comunicantes y desmosomas, se localizan en la cara basolateral de la célula epitelial. Otros elementos, como la leucinoaminopeptidasa (Desnuelle, 1979; Louvard, 1980; Kerjaschki *et al.*, 1984), el canal de Na^+ sensible a amilorida (Lewis *et al.*, 1976), canales de K^+ (Bolivar *et al.*, 1987; Ponce *et al.*, 1991a), la dipeptidil peptidasa, la L-glutamyl transferasa (Inoue *et al.*, 1983) y los transportadores Na-glucosa y Na-aminoácidos (Rabito y Karish 1983, Wolfram *et al.*, 1984) están localizados en la membrana apical de la célula.

b) *Distribución polarizada en un tipo celular y no en otro.* La Na-K-ATPasa exhibe una distribución homogénea en la membrana celular del eritrocito, mientras que, en células de vejiga urinaria, páncreas,

piel de rana y células tubulares de riñón está localizada sólo en el lado basolateral (Mills *et al.*, 1975, 1978; Blitzer *et al.*, 1978; Bundgaard, 1981; Cerejido *et al.*, 1980; Lamb *et al.*, 1981; Contreras *et al.*, 1989).

c) *Polaridad opuesta en dos tipos de células epiteliales diferentes.* Un ejemplo es la Na-K-ATPasa que, como se dijo anteriormente, se encuentra en la región basolateral de la mayoría de los epitelios, sin embargo en el epitelio de glándulas sudoríparas se la ha encontrado del lado apical (Quinton y Tormey, 1973). Esta asimetría bioquímica confiere a las células epiteliales la capacidad de bombear iones vectorialmente.

d) *Una especie proteica puede polarizarse en caras opuestas del mismo tipo celular.* Brown y colaboradores (1988) han demostrado que algunas células epiteliales intercaladas del túbulo colector cortical del riñón de la rata tienen sus H^+ -ATPasas insertadas en la cara apical, mientras las células vecinas, del mismo tipo, tienen la polaridad opuesta.

e) *Diferentes especies proteicas en la misma célula pueden diferir en su grado de polaridad.* El grado de polarización apical/basolateral de una especie proteica es estudiado a través de la adhesión a la membrana

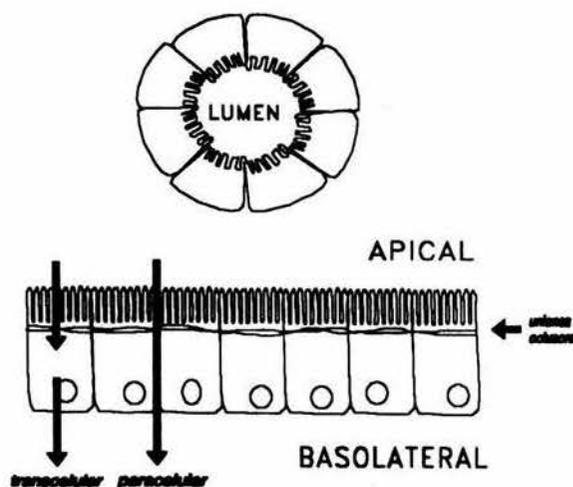


Figura 9. Representación esquemática de la polarización de las células epiteliales. Arriba: estas células forman un epitelio, en donde la cara apical se orienta hacia el medio externo (lumen o luz) y la basolateral hacia el medio interno (intersticio), en la frontera entre las dos caras se encuentra la unión oclusora. Abajo: esta asimetría morfológica permite el transporte vectorial de sustancias ya sea a través de la propia célula (via transcelular) o a través de los interespacios (via paracelular).

plasmática o fracciones de regiones apicales o basolaterales de sondas fluorescentes, radioactivas y químicas (Fujita *et al.*, 1973; Meier *et al.*, 1984; Lisanti *et al.*, 1988). Estas técnicas no están exentas de errores debidos a contaminaciones con otras fracciones, ruido de fondo y enlaces no específicos. A pesar de esas fuentes de incertidumbre, diferentes proteínas de membrana de la misma célula pueden exhibir un amplio rango de polarización apical/basolateral, de tal manera que el exceso de una especie de proteína en una cara puede ser de solo un 10% mientras en otros casos puede estar exclusivamente en ella (Rodríguez-Boulán, 1983).

1.2.2 Direccionamiento polarizado de proteínas

La mayoría de las proteínas de membrana, incluyendo a los canales iónicos, son segregados a través de compartimentos membranales e incorporados a la membrana mediante un proceso de fusión exocítica que involucra una continua gemación y fusión de vesículas fosfolipídicas. Durante los primeros estadios de síntesis, tanto las proteínas apicales como las basolaterales se codistribuyen en el retículo endoplásmico y son cotransportadas progresivamente a través de los compartimentos *cis*-, medio y *trans*- del complejo de Golgi, es decir, comparten la misma ruta, pero a partir del *trans*-Golgi se lleva a cabo su discriminación, separación y subsecuente migración hacia la cara apical o basolateral.

Se han encontrado dos mecanismos distintos por los cuales se distinguen las proteínas que han de ser distribuidas diferencialmente en una u otra cara. En el primero, ambos tipos de proteínas son transportadas del aparato de Golgi a la membrana basolateral y, posteriormente, las proteínas apicales son endocitadas y reubicadas correctamente como ha sido demostrado por Contreras y colaboradores para el caso de las ATPasas de las células MDCK (Contreras *et al.*, 1989). En el segundo mecanismo diversos tipos de proteínas son transportadas a través del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi, pero al final de este son segregadas en un compartimento conocido como red tubular del *trans*-Golgi (TGN). En esta región se lleva a cabo una clasificación, tras la cual las proteínas son incorporadas a vesículas de transporte, que migran posteriormente hacia la cara correspondiente (Chrispeels and Stahelin, 1992).

1.2.3 Señales de identidad en las proteínas apicales y basolaterales.

El estudio de la clasificación de proteínas que han de ser enviadas a uno u otro polo de la membrana se ha enfocado recientemente hacia el análisis de su secuencia, o bien a la de los mRNAs que las codifican, para encontrar alguna peculiaridad en su composición o estructura que explique su distribución. Así se ha encontrado que algunas proteínas poseen una "tarjeta de identidad" (*tag*), que puede ser una señal intrínseca en su secuencia de aminoácidos o en los grupos de carbohidratos que se añaden al péptido durante su síntesis. Por ejemplo, las hidrolasas son

conducidas hacia los lisosomas por poseer cadenas laterales de manosa, que son reconocidas en el complejo de Golgi por receptores específicos (Sly, 1982). Sin embargo, los carbohidratos ligados al péptido por su terminal NH₂- no parecen mediar el direccionamiento de proteínas epiteliales de la membrana plasmática (Green *et al*, 1981).

Siendo posible que las proteínas presenten un mensaje intrínseco que funcione como una tarjeta de identidad se han ideado técnicas que permitan identificar las regiones o *tags* involucradas en el direccionamiento o "sorting". Roth y colaboradores (1987), construyendo proteínas quiméricas a partir de proteínas HA (hemaglutinina) y proteínas G, e incorporándolas en células MDCK, sugirieron que la señal de identidad puede residir en el ectodominio de la proteína. Al respecto, Brewer y Roth (1991) han encontrado que el cambio de solo un residuo de aminoácido en el dominio citoplásmico altera la distribución polarizada de HA.

La distribución polarizada de proteínas puede depender también de modificaciones postraduccionales que sirvan como señales. Lisanti y Rodríguez-Boulan (1990) encontraron que proteínas de membrana ancladas a través de glicosil fosfatidil inositol (GPI) son enviadas preferentemente a la membrana apical de células epiteliales. La secuencia de mRNA que no codifica podría tener otras clases de señales que podrían especificar la distribución de especies de mRNAs. Esto se ha observado en varios tipos de células de *Drosophila* y *Xenopus*, y en células de vertebrado (Revisado en Gottlieb, 1990). La traducción de proteínas en áreas localizadas también puede ser un componente importante de la distribución final de las proteínas de membrana, como se ha demostrado para algunas células epiteliales, en donde se ha observado una asociación del aparato de traducción (RNA mensajero, polisomas y factores de iniciación) con el citoesqueleto en áreas localizadas polarizadamente, lo cual podría indicar que estos mecanismos pueden estar influyendo en la distribución localizada de algunas proteínas (Revisado en Hesketh y Pryme, 1991).

1.3 Modelo Experimental.

En años recientes se han dado grandes avances en el conocimiento de los mecanismos que inducen la polarización de las células epiteliales. Se sabe, por ejemplo, que ciertos factores extracelulares como los componentes de la matriz extracelular y los contactos celulares disparan los mecanismos que llevan a la célula a adquirir fenotipos de polarización, tales como cambios morfológicos o la expresión de determinadas proteínas en su membrana, aspectos que se encuentran ausentes en una célula no polarizada (Levine *et al.*, 1985; Talavera, 1993).

En el caso de las células epiteliales se ha observado que cuando ocurre su polarización, se diferencia la membrana en un dominio apical y uno basolateral, y la aparición de complejos de unión en los interespacios. Ambas características se presentan sólo cuando las células forman parte de una monocapa epitelial. En estas circunstancias, el epitelio muestra una especialización en el transporte vectorial de sustancias. A la fecha se siguen estudiando los mecanismos intra y extracelulares que participan en la polarización de estas células. En nuestro laboratorio estudiamos este fenómeno utilizando células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) como modelo experimental. Estas células

son una línea epitelial derivada de riñón de perro (Madin and Darby, 1956), las cuales cuando son cultivadas forman monocapas que tienen las propiedades de un epitelio: forman uniones oclusoras con sus vecinas y polarizan su membrana en un dominio apical y uno basolateral (Cerejido *et al.*, 1978a; Cerejido *et al.*, 1978b). Hemos observado que el tratamiento de una monocapa madura de células MDCK con tripsina-EDTA provoca una pérdida de los rasgos diferenciales de cada célula. Es decir, las células pierden tanto su polaridad como sus uniones y, de tener una forma irregularmente cilíndrica con abundantes microvellosidades en la región apical y profusas interdigitaciones laterales, pasan a ser células esféricas en donde desaparecen las microvellosidades y las interdigitaciones, y reducen drásticamente la superficie de su membrana (Cerejido, 1978a, b ; Ponce *et al.*, 1991b). No obstante, cuando las células se resiembran en un medio adecuado, éstas reestablecen las características originales.

1.3.1 Distribución polarizada de canales iónicos en células MDCK.

En trabajos previos se ha demostrado que las células MDCK maduras presentan corrientes de K^+ y Cl^- que contribuyen en su totalidad a la forma y magnitud de las corrientes iónicas totales en estas células (Stefani y Cerejido, 1983; Paulmichl *et al.*, 1985). Recientemente se ha demostrado que los canales iónicos a los cuales se deben estas corrientes están distribuidos polarizadamente en la membrana de células MDCK confluentes (Ponce *et al.*, 1991 y 1991a). El dominio apical tiene 4 tipos diferentes de canales de K^+ : (1) un maxi K de 220 pS dependiente de Ca^{2+} y voltaje (un Maxi-K) (Bolívar y Cerejido, 1987); (2) un canal de 109 pS probablemente relacionado con el canal descrito por Kolb y colaboradores (1987) para células MDCK subconfluentes; (3) un canal de 89 pS y (4) uno de 31 pS, todos ellos distinguiéndose entre sí por sus curvas de probabilidad de apertura así como el valor de sus parámetros cinéticos. El dominio basolateral presenta un quinto tipo de canal de 26 pS con propiedades cinéticas y curva de probabilidad de apertura distinta a la del canal de 31 pS localizado en el lado apical (Ponce y Cerejido, 1990). De la misma manera hasta el momento sólo se ha identificado un tipo de canal de Cl^- de 46 pS en la membrana basolateral de estas células MDCK confluentes (Ponce *et al.*, 1991a), y uno de 400 pS en células MDCK subconfluentes (Paulmichl, 1991).

1.3.2 Reducción de la magnitud de las corrientes de K^+ y de la superficie membranal mediante el tratamiento de células MDCK con tripsina-EDTA.

Como ha sido demostrado por Ponce y colaboradores (1990, 1991b) las células MDCK después de ser tratadas con tripsina-EDTA, reducen drásticamente la magnitud tanto de sus corrientes de K^+ como de su superficie de membrana (figura 14). La reducción en el número de canales ha sido explicada con base en dos posibles mecanismos: 1) endocitosis de grandes porciones de membrana plasmática conteniendo canales, esto como resultado de la disrupción de los contactos establecidos entre una célula y otra, y a que las células reducen importantemente su

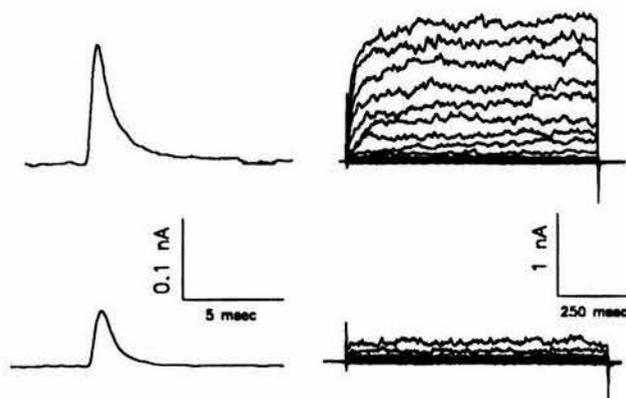


Figura 10.- Arriba: Corrientes capacitivas (izquierda) e iónicas (derecha) registradas de una célula en monocapa madura. Abajo Registros de una célula recién sembrada. Tomado de Ponce et al, 1991b.

superficie de membrana al adoptar una forma esférica, perdiendo sus microvellosidades en la cara apical e interdigitaciones en el espacio lateral. 2) degradación proteolítica de los canales que no son endocitados y que permanecen en la superficie de la membrana expuestos al efecto de la tripsina. La comprobación de que el tratamiento con tripsina-EDTA no daña la viabilidad de las células viene de la observación de que la conductancia inespecífica no se incrementa durante el tratamiento con tripsina, y que las células son capaces de restaurar tanto sus canales como su membrana, proceso que probablemente se inicia tan pronto como las células son sembradas.

1.3.3 Restauración de las corrientes de K^+ y de la superficie membranal en células recién sembradas.

Como se mencionó arriba, las células MDCK reducen la magnitud de sus corrientes de K^+ y de su superficie de membrana después de ser tratadas con tripsina-EDTA, no obstante ambas las recuperan en un lapso de 24 horas (Ponce *et al.*, 1991b). La cinética de restauración tanto de canales iónicos como de superficie membranal, ha permitido ensayar diferentes drogas que bloquean pasos específicos en la síntesis y transporte a la superficie de membrana de diversas proteínas de membrana, en particular los canales iónicos (Ponce *et al.*, 1991). La recuperación de las corrientes de K^+ es seriamente afectada por actinomicina D y cicloheximida que inhiben la transcripción y la síntesis protéica respectivamente (figura 10). Estos resultados fueron obtenidos en células durante las 5-6 horas de tratamiento, indicando que los canales son sintetizados *de novo*.

Ponce y colaboradores (1991b), observaron también que drogas que afectan a los elementos del citoesqueleto (Citalacina-B y Colchicina) también impiden la inserción de canales a la membrana, hecho que sugiere fuertemente que los canales son insertados a la membrana mediante eventos de fusión exocítica. La observación de que la Citalacina-B inhibe la restauración de canales de K^+ sin producir un efecto significativo sobre la adición de superficie de membrana es evidencia de la participación de más de un grupo de vesículas citoplásmicas cuyos eventos de fusión exocítica son controlados independientemente por la célula (Ponce *et al.*, 1991b).

Recientemente Talavera (1993) ha demostrado que la recuperación de la conductancia al K^+ y de membrana

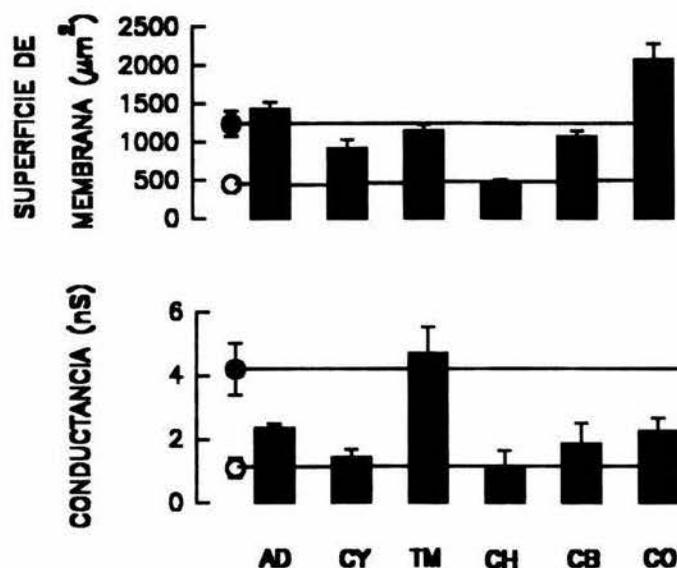


Figura 11.- Efecto de drogas inhibitoras de procesos celulares sobre la recuperación de membrana (arriba) y de conductancia a potasio (abajo) en células MDCK tripsinadas. Los círculos vacíos representan el valor inicial de cada variable (20-45 minutos después de sembradas). Los círculos llenos indican los valores alcanzados por células control de 4 a 6 horas después de sembradas. AC: Actinomicina D. CY: Cicloheximida. TU: Tunicamicina. CH: Cloroquina. CB: Citocalasina B. Tomado de Ponce et al, 1991b.

basolaterales, es preciso que estas tengan una señal que las identifique, ya sea como basolaterales o apicales. De esta forma nuestro interés es descubrir precisamente esas señales. El enfoque consiste entonces en conocer las secuencias de los mensajeros que codifican para los canales apicales y basolaterales de las MDCK, deducir su secuencia de aminoácidos y compararlas entre sí, buscando una secuencia que sea común a los apicales y que no tengan los basolaterales, o viceversa. Para esto es preciso primeramente aislar, clonar y secuenciar los genes que codifican para los distintos canales de las MDCK.

Existen diversas estrategias para clonar canales iónicos. Dentro de estas técnicas se encuentra la de PCR utilizando oligos degenerados obtenidos a partir de la secuencia de genes de canales de K⁺ (Christie *et al*, 1989), o la de hibridación a alta estrictividad de cDNAs de canales de K⁺ conocidos contra genotecas de las células o cultivos de interés (Lester, 1990). La desventaja es que si la secuencia de los mensajeros que codifican para el o los canales que se quieren estudiar no tienen ninguna relación con los canales ya secuenciados, el método nunca funcionaría. Otra

plasmática en las MDCK es dependiente de Ca²⁺ y de los contactos celulares. Este autor ha demostrado que el Ca²⁺ y los contactos célula-célula, actuando en forma excluyente, no son suficientes para que las células restauren completamente sus canales o su membrana. El hecho de que ambos factores sean requeridos, indica que probablemente estén involucradas moléculas que permiten la adhesión entre las células y que a su vez estas requieren de la presencia extracelular de Ca²⁺.

1.3.4 Estrategia experimental

Recapitulando, sabemos entonces que las MDCK tienen canales iónicos de los cuales la mayoría son de K⁺, que estos se encuentran polarizados y que al ser tratadas las células con tripsina-EDTA los pierden, pudiendo recuperarlos nuevamente. Además de esto, suponemos que, para que una célula pueda reconocer las proteínas apicales de las

técnica de reciente aplicación es la utilización de mutantes de levaduras que carecen de canales de K^+ , las cuales solo crecen en sustratos apropiados cuando un mRNA o un gen de un canal de K^+ les es transfectado (Chandy *et al*, 1992); su desventaja es que solo se puede aislar un canal cuando se han obtenido evidencias mediante los métodos anteriores de su presencia.

Una cuarta y última estrategia es la de clonación por expresión (Colman 1987; Soreq y Seidman, 1992). Esta técnica es un sistema de expresión *in vivo*, que consiste en inyectar material genético, generalmente mRNA, de las células o tejido de interés a ovocitos de *Xenopus laevis*. Después de varios días de incubación, los ovocitos son capaces de traducir esos mensajeros en proteínas, y en el caso de canales y bombas, expresarlos en su membrana. Posteriormente, con un sistema de fijación de voltaje con dos microelectrodos, se puede registrar la corriente iónica de la membrana y caracterizar su naturaleza iónica. Con esto se puede saber si en el mRNA total inyectado al ovocito estaba incluida una especie que codifique para cierto canal iónico de interés. Posteriormente se puede fraccionar el mRNA total por peso, de manera que al inyectar separadamente cada fracción a los ovocitos se puede determinar el peso aproximado del mRNA que codifica para el canal. De la fracción positiva se puede construir una genoteca de expresión, probando las clonas hasta encontrar aquellas que específicamente codifiquen para los canales iónicos deseados (*i.e.* Paulmichl *et al*, 1992). Esta técnica ha permitido, en contraparte a los sistemas de traducción utilizando lisados celulares, o reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR), la expresión, clonación así como estudios sobre su función de una gran cantidad de canales iónicos (para una revisión vease Lester, 1991).

La técnica de clonación por expresión tiene sus bases en las propiedades intrínsecas de los ovocitos: Durante la ovogénesis los ovocitos acumulan grandes cantidades de enzimas, proteínas de almacenamiento y organelos, los cuales forman una reserva materna que será utilizada durante el desarrollo embrionario. Un aspecto crucial en este desarrollo temprano es el gran incremento postfertilización en la síntesis de proteínas, el cual resulta del incremento en la traducción del mRNA materno. No es sorprendente por tanto que una proporción significativa de la reserva materna se encuentre representada por componentes que son requeridos para la transcripción (Kushner *et al.*, 1989). El cúmulo de la reserva materna en cada ovocito consiste de proteínas de la yema, de fosvitina y de lipovitelina, las cuales (~200 μ g/ovocito) provienen de la sangre materna, y que llevan al ovocito hasta alcanzar un diámetro de ~1.2 mm en el último estadio. Estas dos facetas del ovocito -la reserva materna y el tamaño del ovocito- han hecho de él un eficiente sistema de prueba para estudios de transcripción, replicación, ensamblaje, particionamiento, y traducción de macromoléculas inyectadas (Lester 1991).

Esta técnica ha sido utilizada en muchas áreas de la biología celular y molecular, y especialmente en áreas como la neurobiología molecular. La reconocida capacidad de los ovocitos para traducir eficientemente información genética, combinada con su habilidad para ensamblar complejos oligoméricos, incluyendo receptores y canales, e insertarlos en la membrana plasmática para generar respuestas electrofisiológicas, ha hecho de ellos una herramienta muy poderosa para la biología de las proteínas de transporte membranal, ya que ha permitido la expresión heteróloga de numerosos canales iónicos, como los canales tipo *Shaker* (Papazian *et al*, 1987), los canales de K^+ rectificadores

tardíos (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993), el CFTR (Riordan *et al.*, 1989), etc; transportadores, como el transportador de dopamina (Coats and Navarro, 1990), y receptores como el receptor metabotrópico de glutamato (*i.e.* French and Joho, 1992) o el receptor al factor activador de plaquetas (revisado en Lester, 1988). Las técnicas de mutagénesis dirigida, ingeniería de proteínas quiméricas y la reconstitución *in ovo* de moléculas con multiméricas han sido utilizadas en años recientes para dilucidar los papeles funcionales de varios de los componentes moleculares que intervienen en las funciones y propiedades biológicas de dichos conglomerados. Los avances en estas técnicas pueden ser de gran ayuda, e incluso indispensables, en la búsqueda de respuestas sobre la expresión genética, procesamiento postranscripcional y de las funciones biológicas de muchas de las proteínas de transporte, sea cual fuere el tipo celular o tejido en estudio.

II OBJETIVOS

En el presente trabajo me propongo por tanto:

- 1) Estandarizar la técnica de expresión de mRNA exógeno en ovocitos de *Xenopus laevis*
- 2) Demostrar su funcionalidad mediante la expresión de canales de K^+ que han sido clonados previamente
- 3) Inyectar el mRNA de células MDCK seis horas después de haber sido sembradas a confluencia, y caracterizar las corrientes expresadas
- 4) Separar por tamaño los mRNAs y expresarlos en los ovocitos para determinar el tamaño del o de los mensajeros que codifican para canales de las MDCK

Todos estos objetivos como estudio previo para una futura clonación de los canales iónicos de estas células y conocer sus mecanismos de polarización.

III MATERIAL Y METODOS

3.1 Obtención y mantenimiento de *Xenopus laevis*

Hembras adultas de la rana africana *X. laevis* con ovocitos, usualmente de estadios V y VI (Dumont, 1970), fueron obtenidas de Nasco Biologicals Inc. (Fort Atkinson, WI). Las ranas, debido a su condición de ranas acuáticas, son mantenidas en cajas de plástico (50 cm de alto por 90 cm de largo) llenas hasta 20 cm de agua sin cloro (usualmente agua destilada) siendo alimentadas con alimento especial para ranas (Nasco ULT food), manteniéndolas en un fotoperiodo de aproximadamente 10 hr-luz y 14-oscuridad, y a temperatura ambiente.

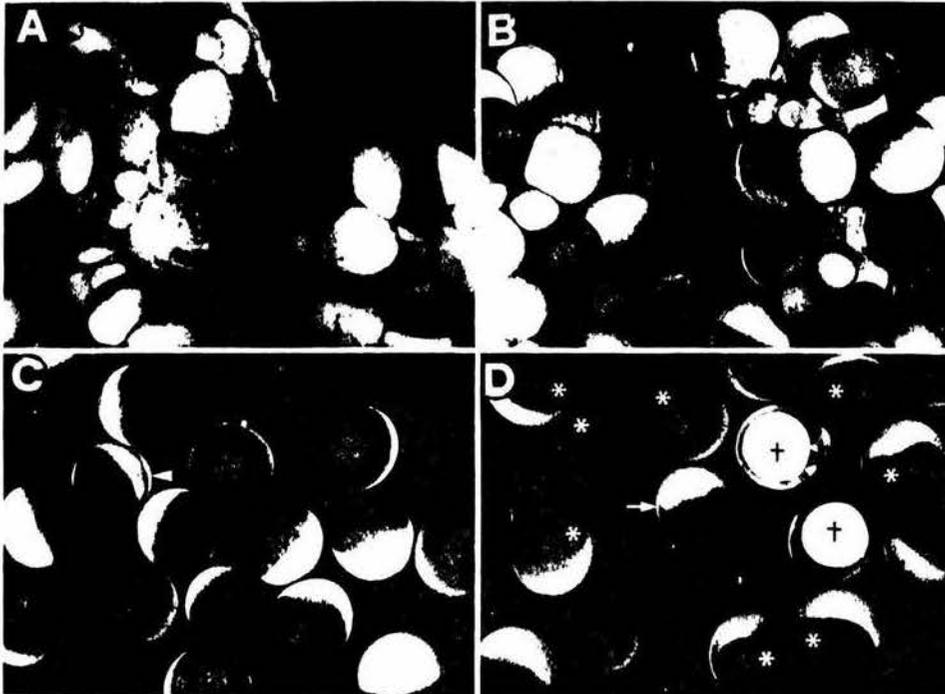


Figura 12. Obtención de ovocitos. (A) Lóbulos ováricos con ovocitos de los estadios I-VI en su interior. los ovocitos en estadios V y VI se diferencian por sus polos vegetal (blanca) y animal (negra) (B). Durante el tratamiento con colagenasa los ovocitos pierden gradualmente las células foliculares hasta llegar a estar completamente defoliculados (C) aunque algunos presentan "capuchones" de células foliculares en alguno de sus polos (cabeza de flecha). Los ovocitos antes de ser inyectados se seleccionan, separándose los ovocitos muertos (+) o los ovocitos cuya polaridad no es perfecta (flecha). En algunos ovocitos es posible observar su núcleo en el polo animal (*)

3.2 Aislamiento de Ovocitos

Se anestesia la rana por inmersión en agua con hielo 5-10 min o hasta que la rana se duerma. Se coloca la rana en una charola, cubriéndola completamente con hielo, salvo en la región ventral, en donde se hace una pequeña incisión para descubrir las gónadas. Con unos forceps finos se tira de las gónadas y se cortan aproximadamente tres o cuatro lóbulos. Se cose la herida en dos etapas, la cubierta interna con catgut y la externa con hilo de nylon. La rana parcialmente ovariectomizada se coloca en una tina con suficiente agua para que le cubra la mayor parte del cuerpo, pero cuidando de que esta no tape las narinas. Después de 2 hr de reposo se le regresa al bioterio.

Los lóbulos extraídos se colocan en solución ND-96 (ver soluciones) y se lavan varias veces. Se disgregan y se rasuran los ovocitos de las células foliculares que las rodean mediante el tratamiento con colagenasa a una concentración de 2 mg/ml durante 90 min. en agitación suave. Se seleccionan los ovocitos que se encuentran en los estadios IV y V y que no presentan maduración meiótica. Posteriormente se les incuban en medio MBS (ver soluciones) a una temperatura de 17 °C (figura 12).

3.3 Transcripción *in vitro* de cDNAs de canales de potasio clonados (*ShA2*, drosófila, y *RCK1*, rata).

3.3.1 Aislamiento de Plásmidos

Se inoculan 20 ml de medio LB adicionado con Ampicilina (50 µg/ml) con la bacteria *E.coli* C600 conteniendo los plásmidos pShA2 ó pRCK1, y se incuban a 37°C con agitación durante toda la noche. Se centrifuga el cultivo a 3500 rpm durante 15 min., y se resuspende la pastilla en 1 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8). Se agregan 2 ml de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS, se prepara en el momento), mezclándose suavemente por inversión. Se incuban esta solución en hielo 5 min. Posteriormente se agregan 1.5 ml de solución III (3 M Acetato de potasio pH 4.8), y se mezcla suavemente por inversión. Se centrifuga a 3,500 rpm durante 10 min. Se recupera el sobrenadante, cuidando de no tomar el precipitado, y se le agregan 3 ml de isopropanol, se mezcla por inversión y se incuban 15 min a temperatura ambiente. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C (Centrifuga Sorvall, rotor SS34).

Se resuspende la pastilla de DNA en 200 µl de agua y se agregan 2 µl de RNasa A (10 µg/ml). Se incuban 30 min a 37°C. Se digiere con proteinasa K; para ello, se le agrega a la muestra de DNA: 30 µl buffer 10X, 30 µl SDS 2%, 37 µl agua, 3 µl proteinasa K 20 mg/ml. Se incuban 1 h a 60°C y se lleva el volumen a 500 µl con agua. Posteriormente se agregan 0.5 ml de fenol saturado en Tris 0.1 M pH 8 y se mezcla y centrifuga 5 min en la microcentrifuga. Se recupera la fase acuosa y se le agregan 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo, se mezcla y centrifuga 5 min. Se recupera la fase acuosa y se le agregan 500 µl de cloroformo, se mezcla y se centrifuga 3 min.

Se recupera la fase acuosa y se le agregan 50 μ l de acetato de sodio 3M pH 7 y 300 μ l de isopropanol, se mezcla e incuba 10 min a temperatura ambiente. Se centrifuga 5 min. Se lava la pastilla con 1 ml de etanol 70 %, y se resuspende en 100 μ l de agua. Se determina la concentración de DNA por absorvancia a 260 nm. (1 D.O.₂₆₀ = 40 μ g/ml)

3.3.2 Electroforesis de DNA (minigel de agarosa al 1%)

Se disuelve 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X, y se calienta para que se disuelva. Se vacia la agarosa (20 ml agarosa 1% + 2 μ l bromuro de etidio 5 mg/ml) y se deja solidificar. Para aplicar la muestra de DNA, se mezcla con buffer de muestra 6X. Se realiza la electroforesis a 100 V utilizando como amortiguador de corrida TAE 1X. Se visualizan las muestras bajo luz ultravioleta mediante un transiluminador.

3.3.3 Restricción de los plásmidos que contienen los canales de potasio clonados

Se incuban 10 μ g de DNA plasmídico 1-2 h a 37°C en 20 μ l de buffer de restricción. Se verifica la restricción por electroforesis en agarosa al 1%. Posteriormente se lleva la muestra a un volumen de 500 μ l con agua y se agregan 50 μ l de acetato de sodio 3 M pH 7. Se elimina la enzima por extracción fenólica. Se precipita el RNA con isopropanol, se lava la pastilla con etanol al 70% y se resuspende en 10 μ l de agua DEPC. Se utiliza 1 μ l para determinar la concentración de RNA por absorvancia a 260 nm. Se analiza el RNA en gel de agarosa al 1%.

3.3.4 Transcripción *in vitro*

El RNA obtenido de la restricción de los plásmidos se incuba 1h a 40°C en un amortiguador estandar de transcripción (ver soluciones), posteriormente se agrega 1 µl de DNasa I libre de RNasa y se incuba 15 min a 37°C. Se lleva a un volumen de 500 µl con agua DEPC, se agregan 50 µl de acetato de sodio 3 M pH 7. Se extrae con fenol para eliminar la enzima, se le precipita y se le resuspende en 20 µl agua DEPC. Se determina la concentración de RNA. Se verifica la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído.

3.4 Cultivo de células MDCK

Las células MDCK fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (MDCK, CCL-34). Se utilizan células entre los pasajes 60 y 90. Las células son cultivadas a 36.5 °C en botellas de plástico desechables (Costar 3150, Cambridge, Mass) con una atmósfera de aire y 5% de CO₂ (Incubadora 417, VIP CO₂, Lab. Line Instruments, Inc, New Brunswick, NY) en 20 ml de medio basal de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM, Grand Island Biological Co. -GIBCO- 430-1600, Grand Island, NY) con 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml del estreptomicina (In Vitro S.A., México D.F.), 0.08 U/ml de insulina (Eli Lilly, México D.F.) y 10% suero fetal de bovino (Flow Laboratories, McLean, Virginia). Este medio completo es denominado CDMEM.

Cada 3 a 4 días se subcultivan para fines de producción o experimentales. Para esto se lava la botella 3 veces con solución salina de Dulbecco amortiguada con fosfatos y libre de calcio y magnesio (PBS sin calcio, GIBCO, 450-1300) y luego se despegan las células con una mezcla de 0.05% de tripsina y 0.05% de EDTA (GIBCO 610-5300). Después de 10 a 20 minutos las células se resuspenden en 16 a 18 ml de CDMEM y una parte de esta fracción se reparte en cajas de Petri desechables de 40 por 40 cm a razón de 10 ml por caja (con una densidad aproximada de 50,000 células por cm²) mientras el resto se regresa a la botella para mantener el cultivo. Cada 2 subcultivos se reemplaza la botella de plástico.

3.5 Aislamiento de RNA total de células en monocapa.

La extracción del RNA total se lleva a cabo siguiendo el método de Chomcynski y Sacchi (1987), el cual se detalla como sigue:

Se remueve el medio de cultivo de las cajas por aspiración y se lavan las células 2 veces con 7 ml de PBS frío sin calcio ni magnesio, manteniendo las cajas en hielo. Se agregan 2 ml de solución D por caja de 90-mm y se raspan las células con un "Police-Man". Se coloca el lisado en un tubo corex de 15 ml tratado con agua DEPC y Horneado.

Se agrega 1/10 vol de Ac. de sodio 3 M pH 5.6 y 1 vol. de fenol (equilibrado en agua), y se mezcla en vortex, dejándosele incubar durante 15 min a 4°C. Se le agrega 0.5 ml de cloroformo isoamilico y se separan las fases por centrifugación a 5K rpm durante 10 min. en una centrífuga Sorvall con rotor SS34. El DNA forma un precipitado blanco en la interfase.

Con una pipeta pasteur, se recupera la fase acuosa superior cuidando de no tomar material de la interfase. Se agrega 1 ml de buffer D a la fase orgánica, se mezcla en vortex y se centrifuga como se indicó anteriormente. Se juntan los sobrenadantes y se agrega 1 vol de cloroformo. Se mezcla en vortex y se centrifuga a 5 K durante 10 min.

Se recupera la fase acuosa y se le agrega 1 vol de isopropanol, dejándosele incubar a -20°C durante 30 min o más (o bien en hielo seco durante 15 min.). Se centrifuga a 10 K durante 30 min para precipitar el RNA. Se resuspende la pastilla en 200 µl de buffer D y se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y estéril. Se lava el corex con 100 µl de buffer D y se juntan en el Eppendorf. Se le agrega 1/10 vol de Acetato de sodio 3M pH 5.6 y 1 volumen de isopropanol para precipitar el RNA. Se agita y se incuba a -20°C durante 30 min o más (o 15 min en hielo seco). Se centrifuga durante 10 min a 4°C en microcentrífuga. Se lava la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifuga 2 min. Se elimina el sobrenadante por succión. Se resuspende en 200 µl de agua tratada con DEPC.

Para almacenar el RNA por periodos prolongados, se le agrega 1 vol de isopropanol y se almacena a -20°C. Para recuperar el RNA se le agrega 1/10 vol de AcNa 3M pH 5.6, se mezcla y se centrifuga 10 min a 4°C. Se lava con etanol al 70% y se resuspende en agua DEPC.

La concentración de RNA se determina midiendo la D.O.₂₆₀ de una alícuota de la preparación final. Para ello se toman 10 µl de la solución de RNA y se mezclan con 400 µl de agua DEPC. Se mide la D.O. Una solución de RNA con D.O.₂₆₀=1 contiene 40 µg/ml de RNA.

3.6 Purificación de RNA poli (A)⁺ por poli(U)-sepharosa

Se resuspenden 0.5 g de poli(U)-sepharosa (BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg USA) en 1.5 ml de Buffer de unión (BiB) y se agita suavemente por 1.5 hrs; este material es suficiente para cargar tres columnas desechables (BioRad) de 0.75 ml de volumen húmedo de poli(U)-sepharosa (1 ml de suspensión).

Se lavan las columnas con 20 volúmenes (15 ml) de Buffer de elución (ELB), seguidos de 20 volúmenes (15 ml) de BiB. Posteriormente se disuelve la muestra de RNA en SDS al 0.5% a 65° C durante 20 min. A continuación se le agrega un volumen de BiB 2X y se incuba a 70° C por 3 min. Se enfría violentamente a 0° C. Se calienta la muestra a 65° C para disolver el SDS, y se pasa por la columna. Se recupera el volumen vacío y se repite dos veces el pasaje.

Se recupera el RNA poli (A)⁻ y el DNA contaminante. Se lleva a una concentración 0.4 M de Na con NaCl 5M y se añade 1 volumen de isopropanol a -20° C. Se incuba en hielo seco 30 min. Se lavan las columnas con 60

volúmenes (45 ml) de BiB para eliminar inespecíficos. Se recupera el poli (A)⁺ pasando 8 ml de ELB, en fracciones de 1 volúmenes, y se le añade a cada una de ellas 0.1607 volúmenes NaCl 5M y 0.2267 volúmenes de H₂O-DEPC agua, para obtener una solución de mRNA en 0.4 M de NaCl. Cada fracción se divide en dos y a cada una se les pone un volumen de isopropanol a -20 ° C, y se incuba en hielo seco 30 min. Se centrifuga a 4°C por 20 min., descartando los sobrenadantes y secando las pastillas al aire. Cada pastilla se resuspende en 10 µl de H₂O-DEPC. Se mide posteriormente la D.O. (A₂₆₀)

3.6.1 Electroforesis de RNA

Gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído. Se mezclan 0.4 g de agarosa, 4 ml buffer MOPS 10X, 28.8 ml agua DEPC, se pesa y se calienta para que se disuelva y se recupera el agua evaporada (llevar al peso inicial). Finalmente, se agregan 7.2 ml de formaldehído. Se vacía el gel y se deja que solidifique (aproximadamente 30 min).

3.6.2 Desnaturalización del RNA

Se mezcla 2.2 µl de RNA y 7.8 µl de sol. desnaturalizante (buffer MOPS 1.3 X, 64% formamida, 23% formaldehído). Se incuban las muestras durante 15 min a 65°C. Se agregan 2 µl de buffer de muestra para RNA y 1 µl de bromuro de etidio. Se utiliza RNA ribosomal como marcador de peso molecular. Se precorre el gel en buffer MOPS 1X a 60 V durante 30 min. Posteriormente se aplica la muestra y se corre el gel a 60 V.

3.7 Fraccionamiento de mRNA por centrifugación en gradiente de sacarosa

Método modificado de Frech y Joho (1992):

Se tratan tubos para rotor Beckman SW 40 Ti (o equivalente) con 0.1% (v/v) DEPC toda la noche y se lavan posteriormente con agua DEPC autoclaveada. Para hacer el gradiente de sacarosa del 10-30% se preparan soluciones de sacarosa (w/w) al 10, 14, 18, 22, 26 y 30% en 10 mM tris-HCl (pH 7.5), 0.5% SARCOSIL, 1 mM EDTA y se tratan con DEPC 0.05% (v/v) toda la noche. Se meten a autoclavar las soluciones por 15 min.. Se colocan los tubos de centrifuga en hielo seco. Se pipetea 2 ml de la solución de sacarosa al 30% y se colocan en el fondo del tubo (no dejando caer la solución por las paredes). Cuando la solución se ha congelado (toma normalmente unos minutos) se pipetea 2 ml de la solución decreciente en concentración y así sucesivamente. El paso final (10%) es omitido debido a que el volumen de la solución se incrementa cuando es congelada. Los gradientes se almacenan a -80° C.

Antes de utilizar los gradientes se deben de colocar en tubos de centrifuga a 4° C y posteriormente agregar

la solución de sacarosa al 10%, dejando espacio para la muestra de mRNA. Se dejan los gradientes de sacarosa a 4° C al menos por 12-14 hr, lo cual permite la formación de un gradiente continuo. Se calienta la solución con mRNA poli (A)⁺ a 70° C por 5 min, se enfría en hielo seco y se coloca en el gradiente de sacarosa. Se centrifuga inmediatamente por 20 hr a 2-4° C en un rotor Beckman SW40 Ti a 25,000 rpm (110,000 g_{max}). Se colectan las fracciones (de 0.4 ml c/u) en tubos Eppendorf nuevos y estériles. Se les agregan 20 μ l de NaCl 4 M y 1 ml de etanol. Se dejan incubando las muestras a -20° C toda la noche. Las muestras se centrifugan a 11,000 rpm por 1 hr a 2 °C. Se elimina el sobrenadante y las pastillas se lavan con 1 ml de etanol al 75% frío (-20° C). Se secan las pastillas de mRNA y se disuelven en agua DEPC autoclaveada. Se guardan las muestras a -80° C hasta ser utilizadas.

3.8 Microinyección

Micropipetas para microinyección: Las micropipetas son elaboradas con tubos de vidrio de borosilicato con diámetro interno de 1.1 mm con capacidad para 10 μ l (Drummond Scientific Co.), previamente horneadas durante 2 hr a 200°C para eliminar RNAsas, utilizando protocolos de dos y tres pasos de estiramiento. Para ello, el tubo es centrado en la resistencia del estirador de pipetas (Flaming/Brown Micropipette Puller Modelo P-87, SUTTER Instruments Co., USA). Se hace pasar una corriente hasta que el vidrio se funde y se estire, después se hace pasar una corriente hasta que se separa el tubo de vidrio y forma así un microelectrodo. La superficie en la punta se rompe contra el electrodo de una microforja, que consiste en un filamento de platino cubierto de vidrio, con el fin de que la punta quede en forma de aguja. El proceso se verifica con la ayuda de un microscopio óptico.

Posteriormente se llenan con aceite mineral en su extremo abierto cuidando de no dejar burbujas en la interfase. La pipeta se inserta entonces en el microinyector (Drummond Digital serie 500). Posteriormente, una alícuota de 1 a 2 μ l se deposita en un pedazo de Parafilm y después se succiona hacia la pipeta con ayuda del microinyector.

Los ovocitos se colocan en cajas de cultivo de 35 x 40 mm (LUX, USA) que contienen en el fondo una malla de plástico. Posteriormente se inyectan los ovocitos con 50-100 nl de mRNA (1-2 μ g/ μ l). Los ovocitos inyectados se incuban durante 2-3 días para permitir la traducción de los mRNA y verificar la expresión. Después de este lapso se registran las corrientes iónicas.

3.9 Sistema de estímulo y registro de las corrientes iónicas expresadas *in ovo*

La figura 13 representa el sistema empleado. Los ovocitos a registrar se colocan en una cámara de lucita con una perforación que es ocupada por un solo ovocito. La cámara se llena con medio MBS y el ovocito inmerso en ella es penetrado con dos microelectrodos conteniendo 3 M de KCl, uno (0.5 -3 M Ω) para la inyección de corriente y otro (3-5 M Ω) para el registro de voltaje. Los diámetros de las puntas de los microelectrodos se

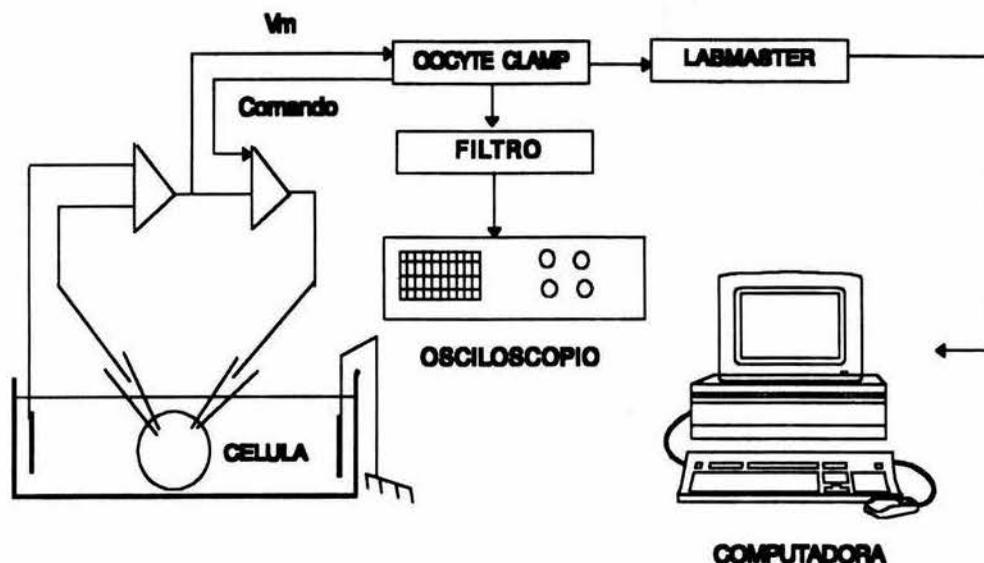


Figura 13. Diagrama esquemático del sistema de estímulo y registro utilizado en este trabajo. La salida del amplificador-comparador de la izquierda (V_m) es la diferencia de potencial entre el electrodo en el baño y el colocado en el ovocito. V_m es comparado con el potencial de comando del "Oocyte Clamp" y cualquier diferencia es inyectada al ovocito a través del electrodo de corriente. Esta corriente fluye a tierra a través de electrodo de tierra en el baño. Si V_m iguala al potencial de comando el potencial es cero.

encuentran en el rango de 1 a 5 μm . El contacto eléctrico entre el sistema de registro y la solución de llenado del microelectrodo se realiza a través de un filamento de plata clorurada. Los electrodos de referencia se encuentran conectados al baño por un puente de agar 3 M de KCl a la tierra virtual. Para reducir el ruido de fondo el electrodo de corriente se blinda con una capa de papel aluminio. Todos los pasos durante la penetración son supervisados bajo un microscopio estereoscópico WILD (Heerbrugg, Ger.). Los contenedores (*holders*) de las micropipetas se sujetan a micromanipuladores hidráulicos (Narishige MF83, Tokyo, Japón), con los que se posicionan las micropipetas.

Durante el registro electrofisiológico de los ovocitos el potencial de membrana es chequeado regularmente. Esto se lleva a cabo mediante la fijación del potencial de membrana del ovocito a valores de voltaje predefinidos usando la técnica convencional de dos microelectrodos. Para ello, un microelectrodo intracelular se utiliza para registrar el potencial intracelular al momento, mientras que el segundo microelectrodo se utiliza para pasar corriente de forma que se mantenga el potencial deseado. Esto se logra utilizando un circuito de retroalimentación que es un elemento intrínseco de la fijación de voltaje.

Para iniciar el registro, los electrodos de corriente y voltaje se aproximan al ovocito, se ajusta a cero la

lectura de voltaje y corriente mediante un par de potenciómetros que son parte del amplificador Oocyte Clamp OC-725A (Warner Instrument Corp.), y se penetra primero con el electrodo de voltaje para medir su potencial de reposo (normalmente de -20 a -80 mV) desechándose aquellos con potenciales mayores de -20 mV. Seguidamente se penetra el ovocito con el electrodo de corriente y se verifica la permanencia del potencial de reposo.

Para registrar las corrientes iónicas se utilizan distintos protocolos de estimulación, dependiendo del experimento a realizar, los cuales se llevan a cabo mediante una computadora a través del convertor digital-analógico usando el programa CLAMPEX (Axon Instruments, PCLAMP versión 5.51). En todos los protocolos realizados se lleva a cabo el procedimiento P/4, el cual consiste en pasar 4 pulsos con un valor del 10% del pulso final de interés, esto con la finalidad de sumar la corriente obtenida de los cuatro pulsos y restarla a la corriente del pulso de prueba, eliminando así los componentes lineales capacitivos y resistivos.

La señal de corriente registrada se preamplifica y se convierte en voltaje. Después se amplifica y se filtra en un pasabajos tipo Bessel (Frequency Devices Inc) y se muestra en un osciloscopio Tektronix 2211 (Beaverton, Oregon). Los registros se almacenan en la memoria de una computadora (STANDARD 286/12 Mhz) para su posterior análisis.

Soluciones

Aislamiento de Ovocitos

ND-96 (sin Ca^{2+}):

96 mM NaCl
2 mM KCl
1 mM MgCl₂
5 mM HEPES pH 7.6

MBS

88 mM NaCl
1 mM KCl
0.33 mM Ca(NO₃)₂
0.41 mM CaCl₂
0.82 mM MgSO₄
2.4 mM NaHCO₃
15 mM HEPES (NaOH) pH 7.6
Ampicilina-Pencilina(10000 u/ml)

Soluciones para extracción de RNA total

BUFFER D

4 M Tiocianato de guanidina
25 mM Citrato de sodio pH 7
0.5 % Sarkosyl
1% β-mercaptoetanol

Soluciones para el aislamiento de RNA poli (A)+

Buffer de Unión (BiB) 2X		Buffer de Elución (ELB)	
NaCl	0.4 M	Formamida	90%
Tris-HCl, pH 7.4	20 mM	Tris-HCl, pH 7.4	10 mM
EDTA	2 mM	EDTA	2 mM
SDS	0.4%	SDS	0.05%

Buffer de restricción

20 µg de DNA
 5 µl buffer 10X
 5 µl enzima Eco RI 20u/µl
 aforar a 50 µl con agua bidestilada esterilizada

Transcripción in vitro

Volúmen (µl):

4 Buffer de transcripción 5X
 2 DTT 100 mM
 2 BSA 1mg/ml
 0.5 RNasin 40 u/µl
 1 Mezcla NTPs (A,C,U y G 2.5 mM)
 1 ATP 10 mM
 1 CTP 10 mM
 1 UTP 10 mM
 2 GpppG 5 mM (CAP)
 4.5 2-4 µg DNA de plásmido
 1 RNA pol SP6 20 u/µl

Medio LB (Luria-Bertani)

para 100 ml:

95 ml de H₂O desionizada

1 gr bactotriptona

0.5 gr extracto de agar-levadura

1 gr NaCl

pH 7

Buffer TAE IX

40 mM Tris-acetato

1 mM EDTA

pH 8

IV RESULTADOS

4.1 SISTEMA DE EXPRESION EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Los ovocitos de *Xenopus* presentan una corriente endógena de Cl^- activada por Ca^{2+} ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$; Barish, 1983). Esta corriente saliente es activada por despolarización y es debida a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, los cuales promueven un influjo de Ca^{2+} hacia el ovocito, activando los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} . Esta corriente de Cl^- , a pesar de tener amplitudes promedio menores de $1 \mu\text{A}$ (Miledi, 1982; Barish, 1983), podría interferir en experimentos subsecuentes, y en especial durante las pruebas de selectividad. Para eliminar esta $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ en todos nuestros experimentos utilizamos solución extracelular MBS adicionada con 5 mM de Mn^{2+} , el cual se sabe que bloquea la $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ (Rudy *et al.*, 1988).

4.1.2 *Expresión de canales clonados.*- Nuestro primer objetivo fue el estandarizar la metodología de expresión en

ovocitos de *Xenopus*. Para ello era necesario el probar mediante el uso de controles positivos que el sistema es funcional, observando para ello las corrientes expresadas, para compararlas luego con las corrientes reportadas para dichos canales en la literatura. Para este primer objetivo empleamos los cDNAs de canales de K^+ de distintas cinéticas y amplitudes de expresión.

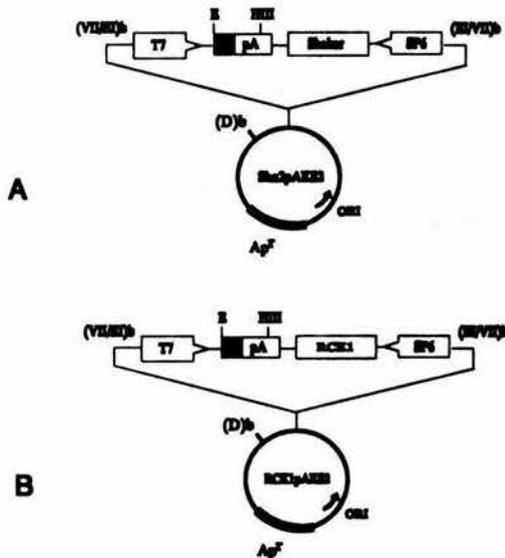


Figura 14.- Representación esquemática de los plásmidos conteniendo los genes de los canales ShA2 (A) y RCK1 (B).

a) *Canal transiente ShA2.*- El canal *ShA2*, también conocido como *Kv1.2* en la literatura actual, es un canal de K^+ clonado a partir de genotecas de expresión de músculo y cerebro de *Drosophila* (Papazian *et al.*, 1987; Kamb *et al.*, 1987). Este canal pertenece a la subfamilia *Shaker*, y es un producto derivado por *splicing* alternativo del gen *Shaker* (Kamb *et al.*, 1988). Los plásmidos conteniendo a este gen o al gen RCK1 fueron diseñados por Martin Stocker y

generosamente otorgados por Olaf Pongs, ambos del Zentrum für Molekulare Neurobiologie, de la Universidad de Hamburgo, Alemania. Este plásmido, el *pAKS2*, es un derivado directo del *pBLUESCRIPT* al cual le fue extraída

la región *βgal*. Cuando se encuentra conteniendo al gen *ShA2* a este plásmido se le denomina *ShA2pAKS2*, mientras que cuando contiene al gen *RCK1* (ver adelante) es denominado *RCK1pAKS2* (figura 14). El plásmido tiene como célula hospedero a *E. coli* de la cepa C600. La figura 14 muestra también el mapa genético de este plásmido, en donde se encuentran indicadas sus principales características: promotor del virus SP6 y promotor específico para la RNA polimerasa del fago T7, señal de poliadenilación del virus SP6, resistencia a ampicilina y un sitio polilinker. En este estudio se realizó la transcripción *in vitro* de este gen utilizando la RNA pol T7 debido a que la orientación del promotor T7 transcribe cRNAs con sentido, mientras que utilizando la RNA pol SP6 se obtienen transcritos antisentido. Los cDNAs de ambos canales se obtuvieron al restringir los plásmidos con HindIII, la cual corta al DNA del plásmido en el sitio en donde se encuentran clonados los genes *ShA2* ó *RCK1*. Las transcripciones *Run-off* fueron realizadas usando aproximadamente 2 µg de DNA molde y utilizando G(5')ppp(5')G (un análogo de CAP), y 15 unidades de RNA pol T7 en un buffer estandar de transcripción. Después de incubar 1 hr a 37° C el molde de DNA fue digerido con DNasa. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron precipitados con etanol, puestos a secar y resuspendidos en H₂O-DEPC a una concentración de 1-2 µg/µl.

Los ovocitos inyectados con el cRNA *ShA2* (50 ng) expresaron una corriente saliente a los tres días postinyección cuya cinética es de tipo transiente, con una amplitud al pico de 17.69 ± 3.23 µA (n= 8) medida a +80 mV (figura 15). Las corrientes expresadas se activan a -10 mV, alcanzando una amplitud máxima e inactivándose rápidamente. La constante de tiempo (τ) para la activación es de 0.35 ± 0.017 ms, y la de la inactivación de 1.10 ± 0.2 . El tiempo necesario para que las corrientes alcancen un máximo después de la despolarización (tiempo al pico) decrece cuando se incrementa la despolarización, alcanzando un valor mínimo a valores depolarizantes altos. El rango en el cual la corriente declina o se inactiva durante el pulso despolarizante es también voltaje-dependiente, aumentando cuando se incrementa el voltaje. Las propiedades del canal *ShA2* descritas arriba concuerdan con las características reportadas en la literatura (Papazian et al., 1987; Kamb et al., 1987; Pongs et al., 1988). Estos resultados, aunados a que los ovocitos no inyectados no mostraron nunca esta corriente (0.5 ± 0.03 µA n=7), proveen evidencia de que la corriente expresada se debe a la activación de canales *ShA2*.

b) *Canal de corriente sostenida RCK1*.- El canal *RCK1*, es el producto de un gen del mismo nombre derivado de genotecas de cDNA de corteza cerebral de cerebro de rata (Bauman et al 1988), siendo un canal homólogo al codificado por el gene *Shaker*. El plásmido que contiene el gen *RCK1* fue descrito en la sección anterior. El cRNA de este gen fue obtenido de la misma manera que para el cRNA *ShA2*.

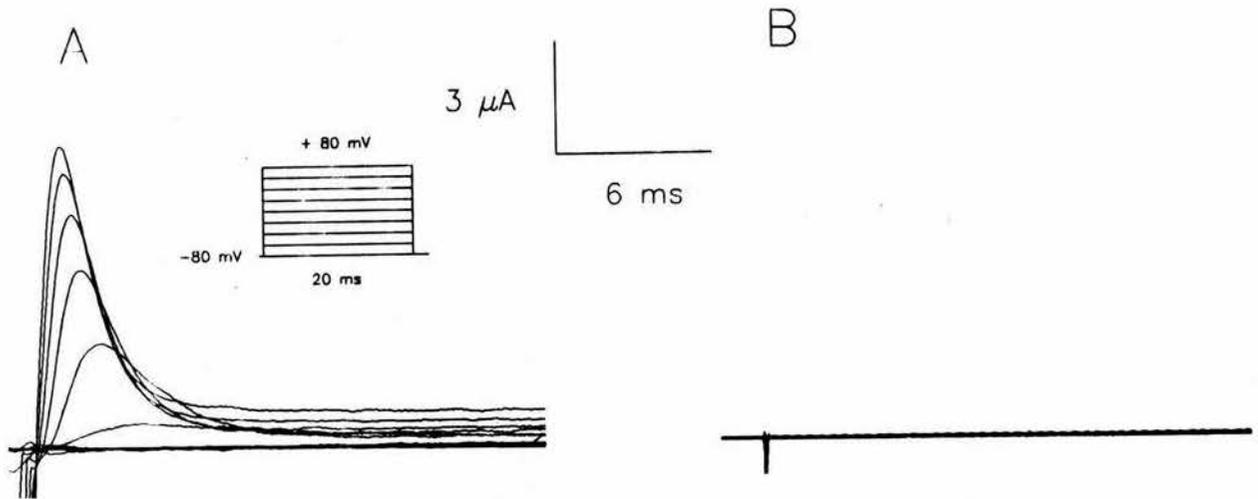


Figura 15.- Corrientes tipo A expresadas en ovocitos inyectados con cRNA del canal ShA2. (A) Registro representativo de las corrientes expresadas al ser estimulado el ovocito mediante pulsos de voltaje despolarizantes (inserto) a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Esta corriente nunca fue observada en ovocitos no inyectados (B).

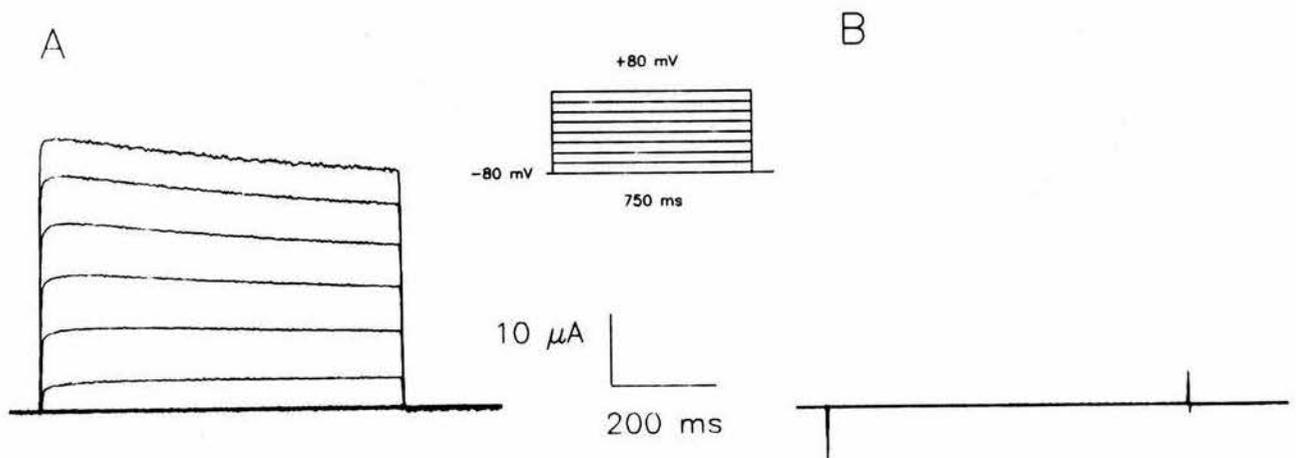


Figura 16.- Corrientes tipo rectificador tardío expresadas en ovocitos inyectados con cRNA del canal RCK1. (A) Corriente representativa obtenida de ovocitos estimulados con pulsos de voltaje despolarizantes (inserto) a partir de un potencial de reposo de -80 mV. (B) corrientes obtenidas de ovocitos no inyectados.

Al aplicar pulsos de voltaje despolarizantes a ovocitos inyectados con 50 ng de cRNA *RCK1* después de tres días de incubación se obtuvieron corrientes salientes con una amplitud, medida a 600 ms y a +80 mV, de $42.01 \pm 7.78 \mu\text{A}$ ($n = 8$) (figura 16). La activación de esta inicia a potenciales de -30 mV. La magnitud de la corriente decrece menos del 20% durante los pulsos de voltaje de 750 ms a un potencial de membrana de +80 mV, mientras que su activación es rápida, iniciando a los 17 ms ($n = 8$). Los resultados descritos arriba concuerdan con lo reportado por Stühmer y colaboradores (1988).

La figura 17 compara las curvas I-V de las corrientes inducidas por los cRNAs *ShA2* y *RCK1*. Se puede observar que ambas corrientes presentan diferentes amplitudes así como diferentes umbrales de activación, las cuales coinciden con lo reportado en la literatura (Kamb et al., 1988; Rudy et al., 1988; Stühmer et al., 1988; Butler et al., 1989). Los

resultados obtenidos de los experimentos expuestos arriba demuestran que el sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus* que se implementó en el laboratorio es funcional. El uso de controles positivos era importante debido a que existe una gran variabilidad entre los ovocitos de una rana y otra, así como variabilidad estacional en la capacidad de expresión de ellos. De manera que de no haber tenido estos controles, no podríamos haber sabido si la carencia de expresión de corrientes de nuestra muestra de interés se debía a un mal manejo experimental o a una deficiencia en la capacidad de expresión de los ovocitos. Una vez comprobado que el sistema, en nuestras condiciones, funciona, procedimos a estudiar la expresión del mRNA de las MDCK.

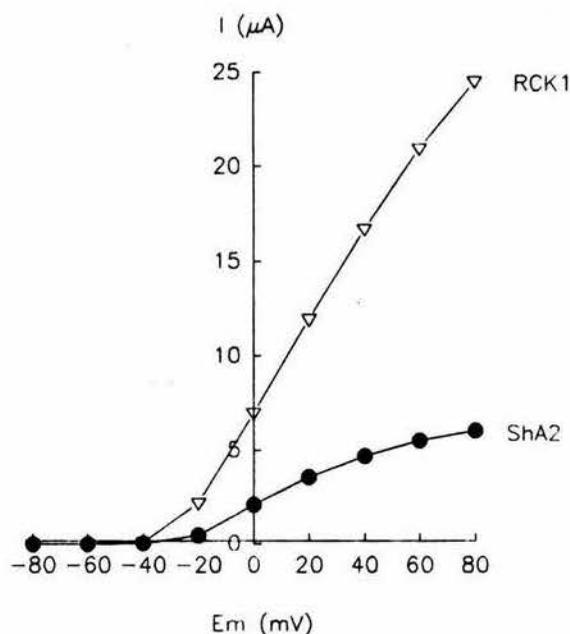


Figura 17.- Curva I-V de corrientes de K^+ inducidas por el mRNA de los canales *RCK1* y *ShA2* expresados en ovocitos de *Xenopus*. Los valores se obtuvieron al medir el valor máximo de la corriente para cada pulso de voltaje.

4.2 Corrientes inducidas por mRNA poli(A)⁺ de células MDCK

En la segunda fase de este trabajo extrajimos el RNA total de las células MDCK sembradas a confluencia 6 horas después de ser tripsinadas, que como habíamos comentado con anterioridad es el tiempo en el cual se da la síntesis de mensajeros de los canales, y posteriormente separamos el mRNA poli(A)⁺ mediante el pasaje del RNA total por una columna de Poli(U)-Sepharsosa. Posteriormente lo inyectamos a ovocitos de *Xenopus* a razón de 50 ng por ovocito. Dichos ovocitos expresaron después de 3 tres días de incubación a 17 °C una corriente saliente (observada como una deflexión positiva) activada por pulsos de voltaje despolarizantes cuya magnitud fue de $3.24 \pm 0.18 \mu\text{A}$ ($n=15$) en respuesta a un pulso de +80 mV. Esta corriente no fue encontrada en ovocitos no inyectados ($0.17 \pm 0.01 \mu\text{A}$, $n = 15$), ovocitos inyectados con H₂O ($0.25 \pm 0.02 \mu\text{A}$, $n = 7$) o en ovocitos inyectados con RNA degradado ($0.25 \pm 0.04 \mu\text{A}$, $n = 7$) (figura 18). Debido a que los ovocitos no inyectados presentan la misma amplitud de corriente que el resto de los ovocitos control, se optó por utilizarlos como únicos controles negativos en los siguientes experimentos.

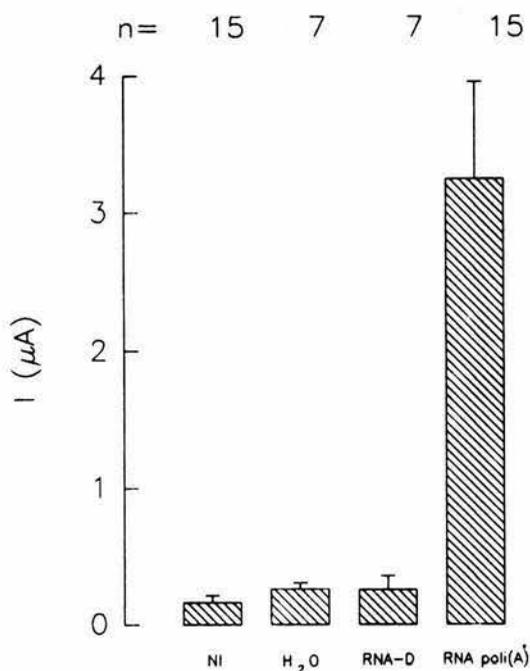


Figura 18.- Amplitud de las corrientes iónicas obtenidas de la medición de corriente a +80 mV y a 600 ms de ovocitos no inyectados (NI) inyectados con H₂O-DEPC (H₂O), RNA degradado (RNA-D) o mRNA poli(A)⁺ de células MDCK.

La figura 19 muestra en su parte derecha los patrones de corrientes observadas en los ovocitos inyectados con mRNA poli(A)⁺ de células MDCK, y la parte izquierda la frecuencia observada para cada una de ellas. El patron de corriente más comunmente observado (tipo I) tuvo una frecuencia de 42.7% (29 de 68 ovocitos), y presenta una lenta activación ($\tau = 114.22 \pm 8.5$ ms), la cual se mantiene a lo largo del pulso despolarizante. El tipo de corriente que siguió en frecuencia fue denominada tipo II. Esta corriente presentó una frecuencia de 35.2% (24 de 68 ovocitos). Esta corriente consiste de una lenta activación ($\tau = 3.62 \pm 0.3$ ms), la cual alcanza un estado estable a los 60 ms, y se mantiene hasta el final del pulso depolarizante. Por su parte, la corriente con menor frecuencia (denominada tipo III) tuvo una frecuencia de 22.1% (15 de 68 ovocitos) presentando una cinética que consiste de una rápida activación ($\tau = 0.99 \pm 0.14$ ms), seguida de una lenta inactivación, la cual tiene una τ de 145.1 ± 14.9 .

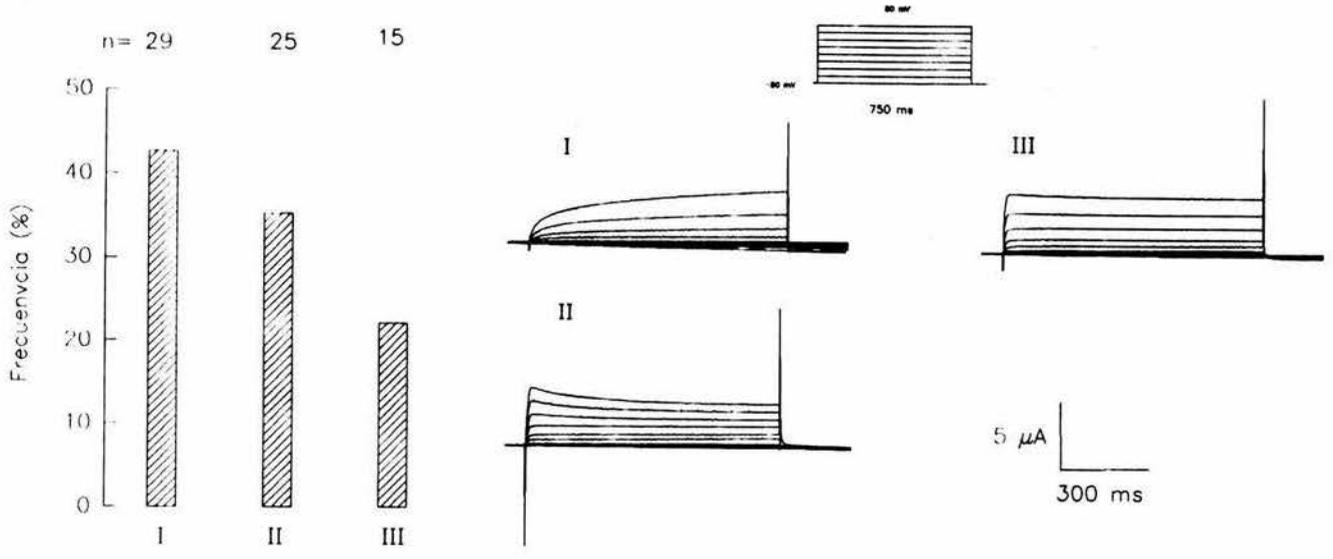


Figura 19.- Patrones de corriente expresadas en ovocitos inyectados con mRNA poli(A) de células MDCK. (A) Frecuencia de los tres tipos de corrientes obtenidas que se presentan en (B).

4.2.1 La corriente expresada es una corriente de K^+

Por conversión, una corriente saliente, observada como una deflexión positiva, se atribuye al flujo de cationes de la célula hacia el medio, o bien del influjo de aniones del medio hacia la célula. Como se mencionó en la introducción, se sabe que el mayor número de canales iónicos presente en las células MDCK es de K^+ (Ponce *et al* 1991a y b). Debido a ello, cabía esperar que la corriente expresada en ovocitos inyectados con mRNA poli (A)⁺ de células MDCK fuese selectiva a este ión. De esta forma, si la corriente saliente expresada fuese provocada por la salida del catión K^+ , la sustitución del anión Cl^- por un anión impermeable como el $MetSO_4$, dicha corriente debería de mantenerse invariable. La figura 20 muestra que la sustitución del Cl^- por $MetSO_4$ no afectó ni la amplitud de la corriente inducida por el RNA poli(A)⁺ de las células MDCK. Esta primera aproximación indicó que los canales podrían ser selectivos a K^+ .

Para probar la selectividad de los canales expresados se midió el potencial de inversión a diferentes concentraciones de K^+ extracelular. Para determinar el potencial de inversión utilizamos un protocolo de estimulación que consta de un prepulso despolarizante (+80 mV), el cual activa una corriente de membrana substancial. Siguiendo al prepulso, se aplica un segundo pulso que fija al ovocito a diferentes potenciales de prueba que van de -80mV a +30 mV. El potencial de prueba en el cual la corriente de cola cambia su dirección es el potencial de inversión. El protocolo experimental y uno de los registros del potencial de inversión en una solución que contiene 40 mM $[K^+]_o$ se muestra en la figura 21. La curva I-V obtenida de este registro muestra que a esta concentración de K^+ extracelular el potencial de inversión es cercano a -40 mV, similar al potencial de inversión esperado de -43 mV predicho por la ecuación de Nernst bajo estas condiciones iónicas (figura 21C). Repetimos estos experimentos con ovocitos en cinco diferentes concentraciones de K^+ (en mM): 5, 40 y 80, respectivamente. Los resultados se encuentran graficados en la figura 22. El potencial de inversión para las corrientes expresadas variaron linealmente con el logaritmo de la $[K^+]_o$, como era esperado para un canal selectivo a K^+ . La línea recta de la figura 25 representa los datos predichos por la ecuación de Nernst .

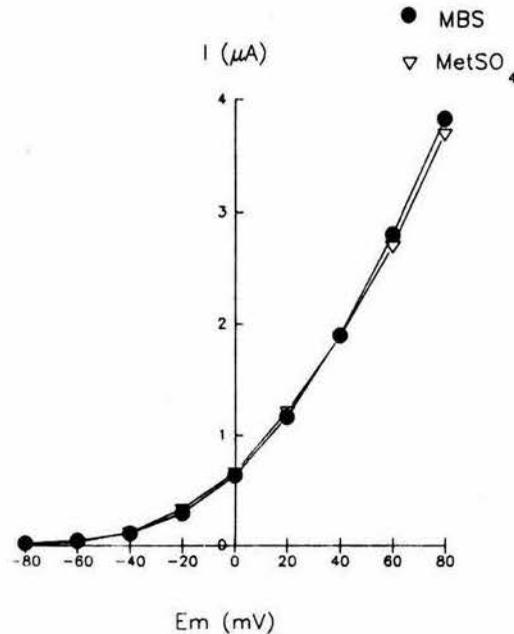


Figura 20.- Curva I-V de corrientes representativas inducidas por la inyección de mRNA de células MDCK en ovocitos en condición control (círculos llenos) y en medio MBS sustituyendo el Cl^- por metanosulfonato ($MetSO_4$).

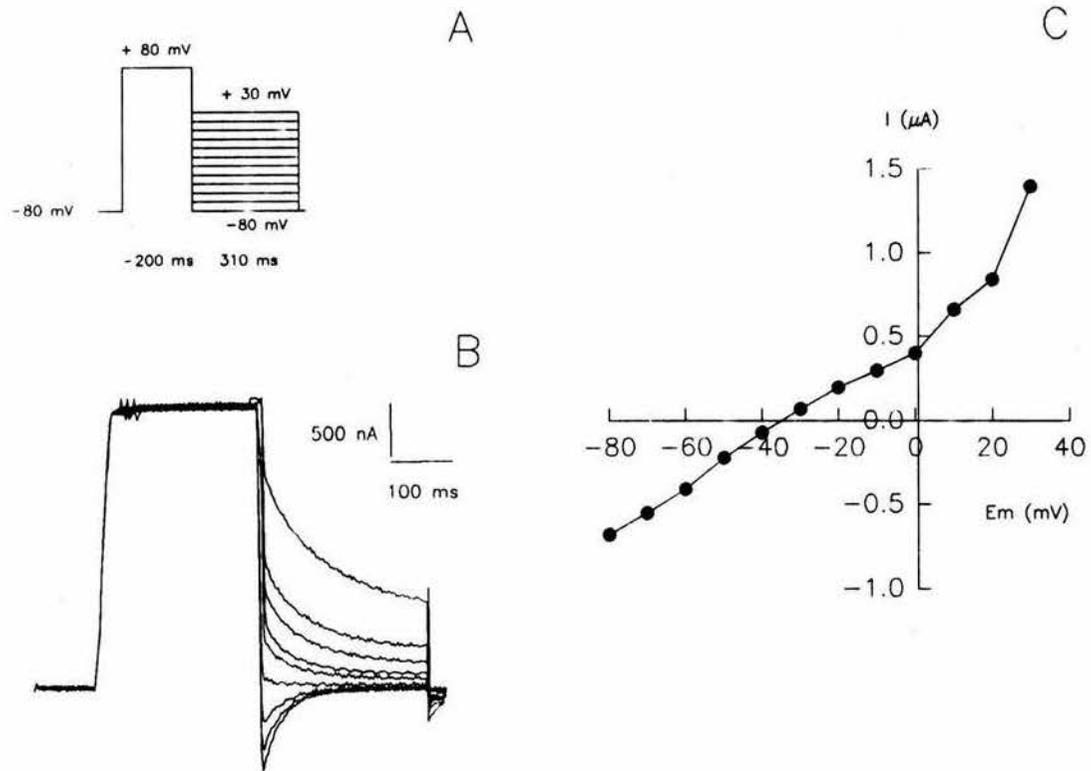


Figura 21.- Efecto del cambio de concentraciones de K^+ sobre los potenciales de inversión de las corrientes expresadas. A, Protocolo utilizado para la obtención de las corrientes de cola. En B se presenta uno de los registros obtenidos y en C la curva $I \cdot V$ de dichas corrientes. La amplitud de las corrientes se obtuvo al medir el valor al inicio de la corriente de cola.

Para calcular el coeficiente de permeabilidad utilizamos una derivación de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949):

$$\frac{P_{Na}}{P_K} = \frac{K_1 - K_2}{Na_2 - Na_1 e^{\Delta_{rev} / (\frac{RT}{F})}}$$

en donde P es la permeabilidad a un ión dado, Na y K las concentraciones de dichos iones en la solución, Δ_{rev} el resultado de la resta entre dos de los potenciales de inversión experimentales, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y F la constante de Faraday. El valor obtenido para las corrientes expresadas sustituyendo los valores de E_{rev} en $[K^+]_o$ de 5 y 80 mM es de $P_{Na}/P_K = 0.01$, indicando que los canales expresados son selectivos a K^+ .

4.2.2 Farmacología de la corriente expresada

Para comprobar que la corriente inducida por el mRNA poli (A)⁺ de células MDCK es debida a canales de K⁺, se estudió el efecto de bloqueadores específicos de canales de K⁺. Para ello probamos los bloqueadores de canales de K⁺ TEA y la toxina 4-AP. La conductancia al K⁺ utilizando TEA a una concentración de 10 mM no fue afectada como lo demuestra la curva I-V expuesta en la figura 23 (n= 3). Pero al aplicar 10 mM de 4-AP se dió una inhibición del 50% de las corrientes que presentan activación rápida y una ligera inactivación (tipo III en la figura 19), siendo su efecto parcialmente reversible (n=3) (figura 24a). Al realizar una resta analógica utilizando el programa CLAMPAN de una corriente representativa en condición control y con 4-AP del mismo ovocito, con el fin de determinar el componente bloqueado de dicha corriente (figura 24 y 25a), se observó que esta es similar al tipo de corrientes obtenidas con mayor frecuencia (tipo II, ver figura 19). Cuando se obtuvieron corrientes tipo I y II y se logró probar el efecto de la 4-AP sobre ellas, se observó que las corrientes se abaten completamente (n=3) (figura 25b). Estos resultados sugieren que las corrientes tipo III pueden ser debidas a la activación de por lo menos dos tipos diferentes de canales, los cuales al parecer son diferencialmente expresados en los ovocitos. Estos resultados no descartan la posibilidad de que exista un ensamblaje heterólogo entre distintas subunidades de canales de K⁺ expresadas en los ovocitos inyectados, o bien a la expresión de una sola especie de mRNA cuyo producto tuviese un diferente ensamblaje.

4.2.3 Determinación del tamaño de los mRNA que inducen las corrientes de K⁺

Una vez que se comprobó que el mRNA de las MDCK es capaz de inducir corrientes en los ovocitos y que esta se debe a canales de potasio, el siguiente paso fue fraccionar el mRNA poli(A)⁺ por tamaño y buscar la actividad funcional de las fracciones obtenidas. Este paso tiene dos objetivos fundamentales: el primero es determinar el tamaño aproximado del mensajero o mensajeros que inducen las corrientes expresadas cuando se inyecta el mRNA poli (A)⁺ total a ovocitos, y el segundo es obtener una fracción enriquecida de los mensajeros deseados, los cuales

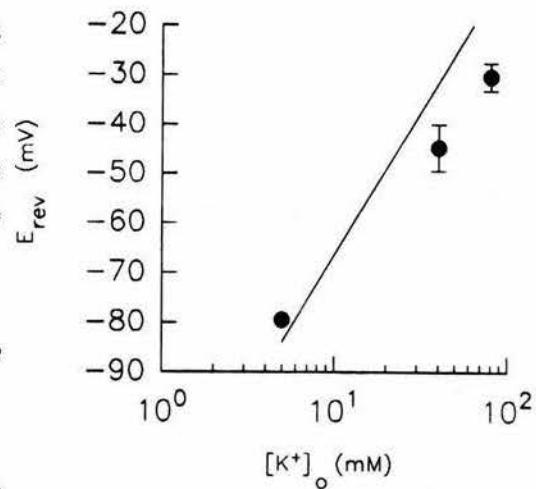


Figura 22.- Valores de los potenciales de inversión obtenidos de las corrientes de cola a diferentes concentraciones de potasio extracelular. La concentración de potasio fue elevada al reemplazar concentraciones isoosmolares de Na⁺ en el medio MBS (n=4). La línea recta representa los valores predichos por la ecuación de Nernst.

potencialmente pueden servir para hacer una genoteca de expresión y así llegar a clonar los canales iónicos deseados.

Con esta finalidad el mRNA poli (A)⁺ células MDCK 6 hrs después de ser sembradas (~78 µg) se centrifugó

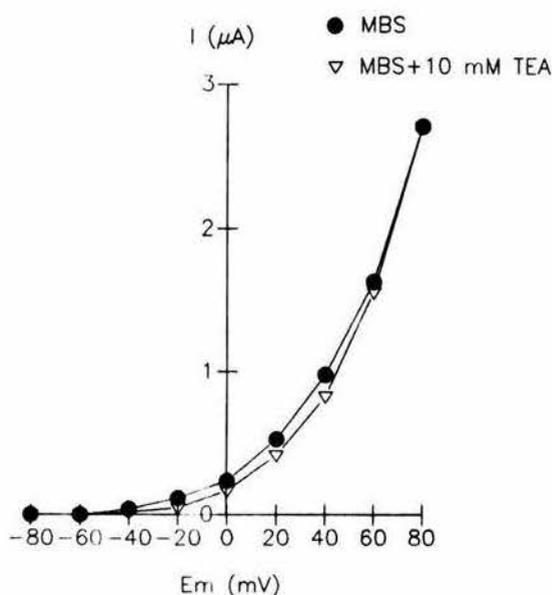


Figura 23.- Efecto del TEA sobre las corrientes inducidas por la inyección de mRNA en ovocitos de *Xenopus*. Curvas I-V de corrientes representativas obtenidas en ovocitos antes (círculos llenos) y después (círculos vacíos) de añadir medio MBS adicionado con 10 mM de TEA. La solución fue mantenida a pH 7.6.

en un gradiente de sacarosa del 10-30%. El mRNA poli (A)⁺ de cada una de las 16 fracciones obtenidas (~5 ml cada una) se precipitó y resuspendió en 10 μl de H_2O -DEPC. Todas las fracciones fueron sujetas a una electroforesis desnaturalizante para determinar el tamaño de los mRNA utilizando marcadores de peso molecular. Los pesos moleculares de cada fracción se presentan en la tabla I. Para la microinyección se tomó una alícuota de 1 μl de cada fracción obtenida del gradiente (por ejemplo 1-2, 3-4, etc.), y se juntaron. Cada una de las 8 muestras así obtenidas (denominadas A, B, C, etc.) se inyectaron a razón de 60 nl por ovocito. Después de 3 días se registraron los ovocitos. Durante el registro los ovocitos fueron mantenidos en medio MBS, sustituyendo el Cl^- por MetSO y adicionándole 5 mM de Mn^{2+} . La amplitud y la cinética, así como un registro representativo de cada una de las corrientes obtenidas medidas a 612 ms y a +80 mV, se presenta en la figura 26. Los resultados obtenidos muestran que las fracciones B y H correspondientes a mensajeros de 6.6 kb y ~0.3 kb

respectivamente, no inducen corrientes diferentes a las obtenidas de ovocitos no inyectados. La fracción A, que contiene mensajeros de ~9 kb, a pesar de que no indujo corrientes de amplitudes diferentes a las controles, indujo una pequeña corriente transiente ($450 \pm 30 \text{ nA}$, $n=9$). Esta corriente nunca fue observada en ovocitos no inyectados (I en la figura 26). La fracción C por su parte indujo una corriente cuya cinética es similar a las corrientes tipo II obtenidas cuando se inyecta el mRNA poli (A)⁺ total. Esta corriente presenta una amplitud de $714 \pm 120 \text{ nA}$ ($n=10$) y una $\tau = 100.11 \pm 5.73 \text{ ms}$ ($n=10$), no existiendo diferencias significativas respecto a las corrientes tipo II ($p = 0.307$), lo que puede indicar que este tipo de corrientes pueden ser debidas a mRNAs de canales de K^+ contenidos en esta fracción de 6.3-6.6 kb. La fracción D (~4.8 kb), indujo corrientes cuya amplitud ($2.199 \pm 0.249 \mu\text{A}$, $n=10$) y cinética son similares a las corrientes tipo III (ver figura 19). Se puede observar que estas corrientes son semejantes en cinética a las obtenidas de la fracción E, por lo que cabe la posibilidad de que esta fracción tenga una contaminación de mensajeros de la fracción D, lo que explicaría la identidad de la cinética y la menor amplitud de corriente.

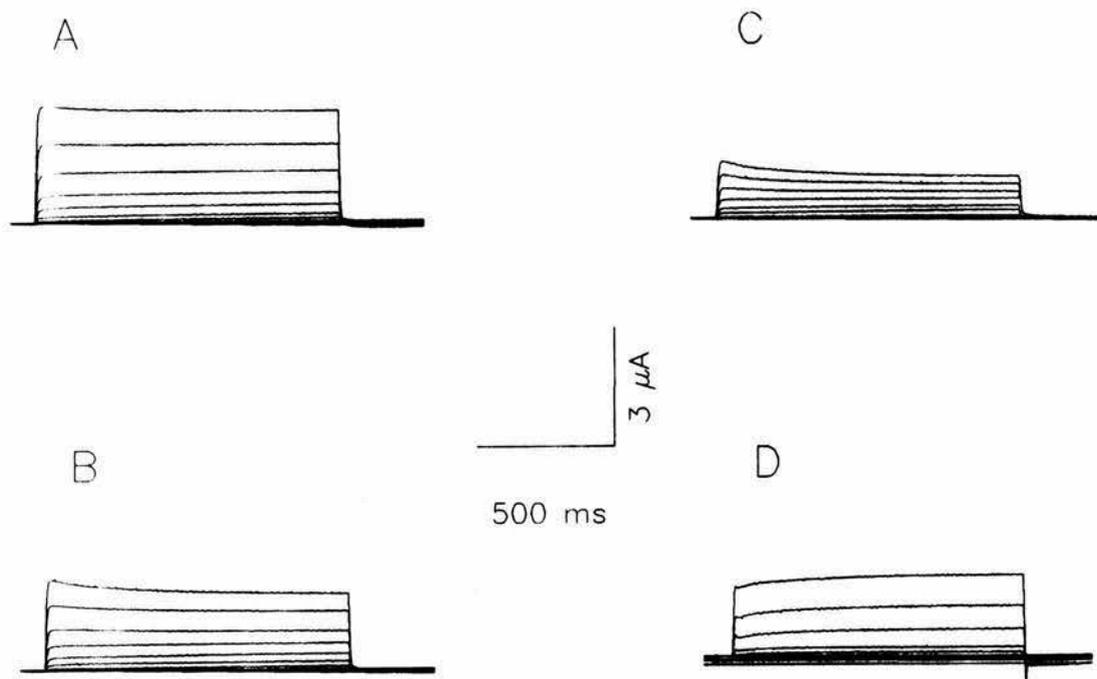


Figura 24.- Efecto de la toxina 4-AP sobre las corrientes tipo III. Corrientes de potasio antes (A) durante (B) y después (C) de añadir 10 mM de 4-AP en el medio extracelular. (D) Registro de la corriente obtenida de la resta analógica de la corriente en ausencia y presencia de 4-AP.

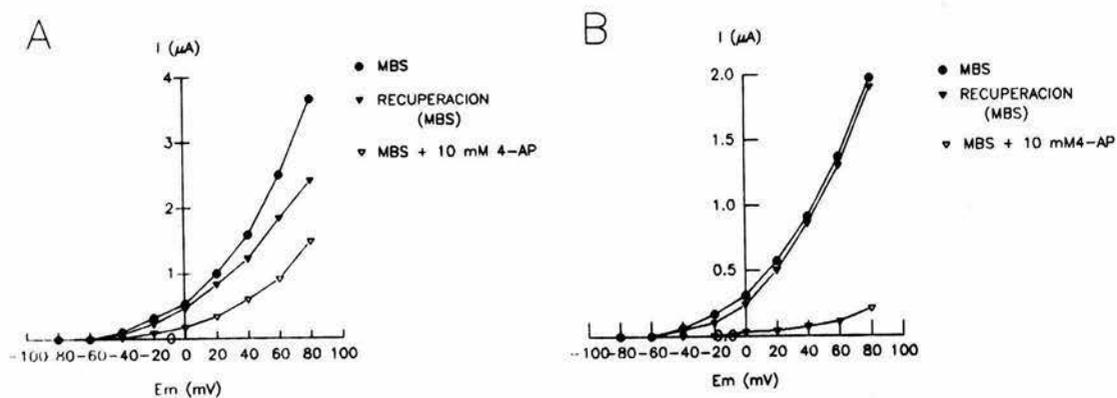


Figura 25.- (A) Curva I-V de las corrientes presentadas en la figura 24 antes, durante y después de la aplicación de 10 mM de 4-AP en el medio extracelular. Este tipo de corriente es parcialmente inhibida por el 4-AP, mientras que las corrientes tipo I y II, como la corriente tipo I presentada en B, son completamente inhibidas. En ambos casos el efecto es reversible.

Tabla I

Peso molecular de los mensajeros obtenidos del fraccionamiento en gradiente de sacarosa

Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H
MW (kDa)	~9	6.6	6.6 - 6.3	4.8	3.1	≤2	0.4	≤ 0.3

El peso molecular fue determinado al interpolar los valores de RF de cada una de la poblaciones de mRNA, visualizadas en un gel de agarosa y teñidas con bromuro de etidio, en una gráfica logarítmica del RF/MW de los marcadores de peso molecular para RNA (Gibco BRL).

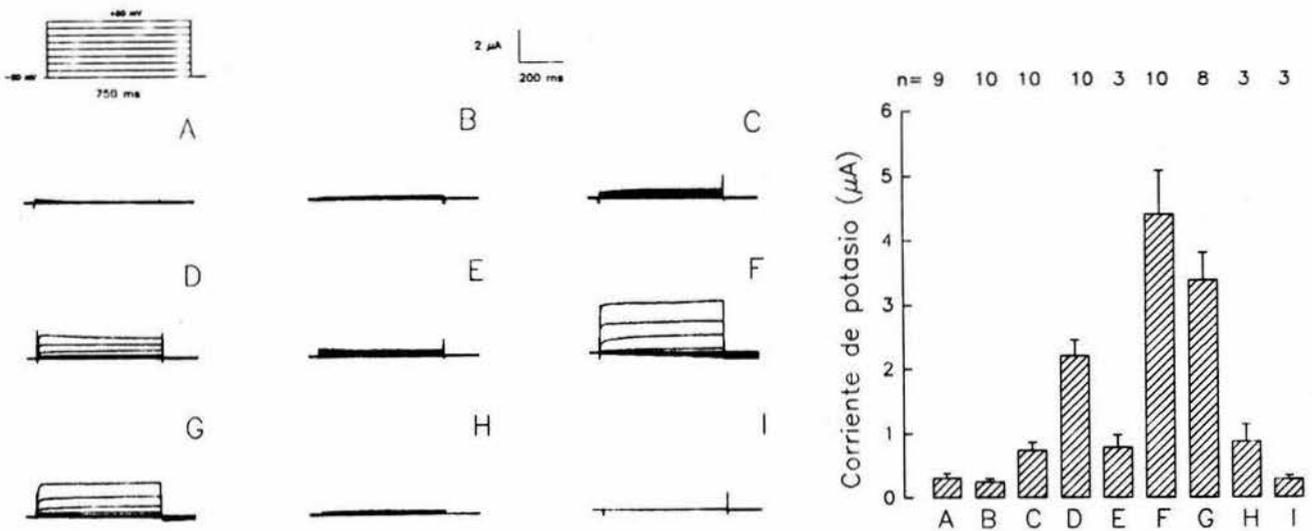


Figura 26.- Corrientes de potasio expresadas en ovocitos inyectados con diferentes poblaciones de mRNA separados por peso mediante gradiente de sacarosa del 10-30%. A la izquierda se presentan ejemplos representativos de los diferentes tipos de corrientes inducidas por cada fracción. Las letras de la A a la H representan las fracciones obtenidas del gradiente; I representa las corrientes de un ovocito no inyectado. En la parte derecha de la figura se presenta la amplitud de la corriente medida a +80 mV y a 600 ms en la población de ovocitos inyectados de cada fracción..

La fracción F (2.06-1.7 kb), indujo la mayor expresión de corriente de todas las fracciones ($4.399 \pm 0.681 \mu\text{A}$), siendo su cinética ($\tau = 55.76 \pm 3.13 \text{ ms}$, $n = 6$) y amplitud similares a las corrientes tipo I, no existiendo diferencias significativas ($p = 0.476$) entre las τ de ambas corrientes. Las τ de las corrientes obtenidas de la fracción G no fueron a su vez significativamente diferentes de las de la fracción F ($p = 0.304$), pero los mensajeros de esta fracción tienen en contraparte 0.4 kb por lo que, a pesar de las similitudes cinéticas, es probable que se trate de mensajeros que codifican para diferentes tipos de canales de K^+ de la misma subfamilia o bien que ambos tipos de corrientes sean diferentes productos de *splicing* alternativo de un solo gen.

V DISCUSION

Desde la introducción del modelo de piel de rana por Koefoed-Johnson y Ussing (KJU) (1958) se han dado grandes avances sobre el conocimiento del paso de sustancias a través de los epitelios pero para nuestro infortunio aún no sabemos porqué las células de un mismo organismo, a pesar de tener exactamente la misma información genética, expresan tipos distintos de canales iónicos y cómo logran distribuirlos polarizadamente.

Las metodologías para responder estas preguntas utilizando los canales iónicos como modelo experimental fueron recientemente abordadas por Ponce y colaboradores (Ponce y Cereijido, 1990; Ponce *et al.*, 1991a,b), quienes utilizaron el modelo de monocapas formadas por la línea epitelial MDCK (Cereijido *et al.*, 1978a,b) observando que hay una distribución asimétrica de canales de K^+ , encontrando que existen en el dominio apical cuatro canales de K^+ distintos, y uno solo en la cara basolateral.

Estos autores demostraron que cuando estas células son tratadas con tripsina-EDTA, adoptan una forma esférica y endocitan parte de su membrana, reduciendo su superficie en un 62%, mientras que el número de canales de K^+ disminuye en una proporción considerablemente mayor (83%), encontrando en contraparte que la conductancia al Cl^- no se ve disminuída. La razón por la cual los canales de K^+ disminuyen drásticamente y en cambio los de Cl^- no, fue explicada en base a que cuatro de los cinco tipos de canales de K^+ son apicales (cara por la cual se agrega la tripsina) mientras que los canales de Cl^- son exclusivamente basolaterales. Con estas observaciones quedaba claro que las células perdían canales iónicos, pero no se resolvía el cómo estos canales son recuperados.

El siguiente paso abordado fue determinar la cinética de reestablecimiento de los canales iónicos a la membrana. Ponce y colaboradores (1991b) demostraron entonces que las células MDCK sembradas a confluencia 6 hrs después de ser tripsinadas necesitan restituir sus canales perdidos por el efecto de la tripsina, debiendo comenzar por leer su genoma y producir el mensajero correspondiente, luego sintetizar el péptido, y enviarlo a la membrana en vesículas exocíticas que se funden con ella, proceso en el que participa el citoesqueleto de microfilamentos y de microtúbulos. Por estos resultados quedaba claro entonces que si se aislaba el mRNA poli(A)⁺ total durante este lapso este podría incluir mensajeros codificantes para canales de K^+ , pudiendo ser clonados utilizando metodologías como la de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El propósito inicial de esta tesis fue entonces el de poner a punto esta metodología y probar su funcionalidad al utilizar canales de potasio que han sido clonados. Los resultados obtenidos de la expresión de los canales ShA2 y RCK1 demostraron que el sistema es funcional, lo que permitió llevar a cabo el siguiente objetivo que fue el de expresar el mRNA poli(A)⁺ de las MDCK obtenido bajo las condiciones experimentales comentadas arriba, todo ello como un paso previo al estudio molecular y clonación de los canales de estas células epiteliales.

Los resultados obtenidos de la expresión de los mensajeros de las MDCK 6 horas después de haber sido sembradas indicaron que en las condiciones utilizadas en este trabajo las corrientes de K^+ se expresan preferentemente, sino exclusivamente, deduciéndose que existen en los mRNA poli(A)⁺ total mensajeros específicos

para canales de K^+ dependientes de voltaje, como pudo ser demostrado por las pruebas de sustitución iónica, selectividad así como de farmacología. Las corrientes obtenidas no fueron homogéneas como cabría haberse esperado de un lote de mRNA homogéneo, sino que variaron en cinética así como en el grado o tipo de bloqueo por drogas. Encontramos también que las corrientes expresadas, en contraparte a lo observado para las corrientes macroscópicas de las MDCK, no son inhibibles por TEA, y que la toxina 4-AP es capaz de disminuir la magnitud de las corrientes expresadas. Estos resultados indicaron que: 1) podría existir más de un tipo de canal de K^+ en la población de mensajeros, 2) que las subunidades que constituyen los canales iónicos codificados podrían haberse traducido y posteriormente ensamblado en heterotetrámeros cada uno con diferente cinética y amplitud de expresión (Isacoff *et al.*, 1990; Christie *et al.*, 1990), si es que en realidad se trata de canales tipo *Sh*, 3) que la cinética de los canales pudo estar influenciada por la concentración de mRNA inyectado y expresado, como ha sido demostrado por Honoré y colaboradores (1992) para algunos de los canales clonados, y 4) que pueden existir en el *pool* de mensajeros moléculas moduladoras de los canales, tal y como ha sido demostrado para algunas de las subunidades β de los canales de K^+ (Rehm y Lazdunsky, 1988; Parcej y Dolly, 1989; Trimmer, 1991).

Algunos de los argumentos a favor de que probablemente se trataba de más de un tipo de canal iónico preferentemente expresado y que los resultados no podrían deberse a los argumentos expuestos arriba provino de los experimentos de bloqueo con la toxina 4-AP, ya que se pudo demostrar que una de las corrientes que presentan inactivación no es resultado de un solo tipo de canal expresado, sino más bien de la adición de dos corrientes, una carente de inactivación sensible a 4-AP y otra cuya cinética presenta una lenta activación e inactivación la cual es parcialmente sensible a esta toxina. La corriente cuyo estado estable se alcanza inmediatamente después de la activación y que no tiene inactivación (corriente tipo II) nunca pudo ser observada junto con la corriente de lenta inactivación, esto quizás se debió a que ambas corrientes podían haber estado sobrelapadas y, debido a que ambas corrientes fueron inhibidas con 4-AP, no pudieron ser separadas. La observación de que las diferentes corrientes observadas aquí tienen su contraparte en las corrientes macroscópicas de las MDCK (Ponce y cereijido, Ponce *et al.*, 1991a y b; Talavera, 1993), es un argumento más que indicó la heterogeneidad de canales.

El hecho de que en las células MDCK existan diferentes tipos de corrientes (Talavera, 1993) y que dichas corrientes hallan sido similares a las obtenidas de la expresión de distintos mensajeros en los ovocitos, indica probablemente que tanto las MDCK como los ovocitos inyectados pueden expresar diferencialmente y preferentemente un tipo de canal iónico dado. Las razones de esta selectividad de traducción pueden ser debidas a 1) la probable existencia de proteínas moduladoras de los canales funcionales codificadas por mensajeros existentes en las células MDCK, los cuales pudiesen encontrarse también en el mRNA poli (A)⁺ total obtenido de ellas, un tipo de regulación similar ha sido sugerido por Pongs (1993) para el caso de neuronas; 2) la existencia de mecanismos intrínsecos de ambas células, los cuales permiten la traducción preferencial de ciertos mensajeros, como ha sido observado para algunos canales de K^+ (Matsubara *et al.*, 1991; Lesage *et al.*, 1992); o bien 3) que exista un transporte de las subunidades hacia distintos polos de la membrana, como ha sido demostrado en el caso de ovocitos

por Peter y colaboradores (Peter et al., 1991) para algunos tipos de canales y receptores, estando quizá este tipo de regulación compartida por ambos tipos celulares.

Es importante resaltar en estos momentos que a pesar de que las células MDCK expresan corrientes semejantes a las observadas en este trabajo, principalmente aquellas que ocurren con mayor frecuencia, se debe de tomar en cuenta que gran cantidad de estudios han demostrado que la cinética de un canal expresado en ovocitos no necesariamente refleja la cinética que presenta el canal en las células de origen, quizás debido a factores intrínsecos del ovocito, como por ejemplo el procesamiento postraducciona l de la proteína del canal (Perney y Kaczmarek, 1993).

La prueba que confirmó la expresión diferencial de canales en los ovocitos provino de la expresión de las diferentes poblaciones de mRNA fraccionado por tamaño. Así, pudimos comprobar que la inyección del mRNA poli(A)⁺ total de las MDCK induce tres tipos diferentes de corrientes, cada una con diferente cinética y amplitud de expresión. Cuando se realizó el análisis de expresión de los mensajeros fraccionados utilizando gradientes de sacarosa se pudo observar que solo las fracciones A (~9 kb), C (6.3-6.6 kb), D (~4.8 kb), F (2.06-1.7 Kb) y G (0.4 kb) indujeron corrientes. Los tres tipos de corrientes fueron similares a las obtenidas de la inyección de mRNA poli(A)⁺ total, a excepción de las corrientes inducidas por los mensajeros de ~9 kb.

Recientemente Desir y colaboradores (1992) clonaron tres canales de K⁺ de las células epiteliales renales LLC-PK₁ utilizando *primers* obtenidos de regiones conservadas del canal *Shaker*. Estos canales, los LLC1, LLC2 y LLC3, no han sido expresados en ovocitos de *Xenopus*, por lo que la cinética y farmacología no pueden ser comparadas con los canales observados en esta tesis. A pesar de ello, el peso molecular del canal LLC1 (450 pb) no es diferente al de la fracción de ~0.4 kb (fracción H). Es de destacar además que el canal LLC1 presenta una alta homología con el canal RBK1 (Mackinnon, 1989; Christie *et al.*, 1989) cuya corriente cuando se expresa en ovocitos es muy similar en cinética al canal expresado por la fracción H. Estos resultados sugieren entonces la posibilidad de que los canales expresados las MDCK sean similares a los del tipo LLC. Un canal de peso similar ha sido expresado por una fracción de mRNA poli(A)⁺ de 0.4 kb obtenido de intestino del pez Lengado por Field y colaboradores (1989).

Las corrientes con inactivación lenta inducidas por los mensajeros de ~4.8 kb fueron idénticas a algunas de las obtenidas cuando se expresa el mRNA poli(A)⁺ total. Esta corriente es muy similar a la corriente tipo D (I_D). Esta corriente presenta una rápida activación, la cual difiere de las corrientes I_A (como las expresadas por el ShA2) principalmente por su lenta inactivación, y ha sido atribuida a canales de tipo RCK o de la subfamilia la RAW (Frech *et al.*, 1989; Rettig *et al.*, 1992). Así, mientras la corriente I_A se inactiva entre los 50 ms, la I_D requiere de varios segundos para decaer completamente, siendo además sensible a 5 mM 4-AP e insensible a TEA (>50 mM), lo cual concuerda con las pruebas farmacológicas obtenidas en este trabajo sobre este tipo de corriente. Esto puede indicar entonces que los canales expresados pueden pertenecer a dichas subfamilias, las cuales como ha sido demostrado por Rettig y colaboradores (1992) no se ensamblan en heteromultímeros con canales de la subfamilia *Shaker* (los cuales

incluyen a algunos canales tipo rectificador tardío como los RCKs).

Las células MDCK presentan en el dominio apical cuatro canales de K^+ distintos, que no se encuentran en el basolateral, siendo todos ellos claramente distinguibles por su conductancia, por la forma de la relación entre la probabilidad de apertura y el voltaje, y por sus características cinéticas. Estos canales, como dijimos anteriormente, pueden ser los que principalmente se encuentren expuestos a la tripsina, siendo necesario que las células resinteticen los que hallan sido degradados. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren la existencia de al menos tres tipos diferentes de mensajeros específicos para canales iónicos cuando son expresados en ovocitos de *Xenopus*, debido a ello es posible especular que probablemente algunos de estos canales correspondan a canales apicales de las MDCK.

Las pruebas farmacológicas realizadas en este trabajo demuestran que los canales expresados presentan diferencias de aquellos canales expresados por las MDCK, ya que la conductancia al K^+ en estas células es completamente inhibida cuando se aplica TEA por la cara externa (Bolívar y Cerejido, 1987; Ponce *et al.*, 1991a). Ramashwami y colaboradores (1990), y Rudy y colaboradores (1991) reportaron esta misma discrepancia entre las corrientes propias de las células y las corrientes obtenidas de la inyección de mRNA total cuando este es expresado en ovocitos, adjudicando estas diferencias a procesos postraduccionales que ocurren en el ovocito, y principalmente al probable ensamblaje heterólogo entre subunidades cuando se inyecta el mRNA total. La respuesta a esta pregunta puede ser respondida cuando se lleven a cabo análisis farmacológicos de las corrientes expresadas por cada una de las fracciones.

En estudios realizados utilizando la técnica de *patch clamp* (Kolb *et al.*, 1987; Friedrich *et al.*, 1988, 1989; Lang *et al.*, 1990, 1991) se han descrito canales de potasio con características de rectificador entrante en las MDCK. Este tipo de canales nunca fue observado en los ovocitos inyectados por lo que, debido a que este tipo de canales presenta un alto grado de expresión cuando se inyecta mRNA total (Cui *et al.*, 1992; Kubo *et al.*, 1993), cabe suponer que los mensajeros que los codifican no existen o bien se encuentran pobremente representados en el mRNA poli(A)⁺ total obtenido 6 hrs después de haber sido sembradas las células a confluencia. Por otra parte, Takumi y colaboradores (Takumi *et al.*, 1988; Murai *et al.*, 1989) han reportado que el cDNA del canal I_{K1} , obtenido de células epiteliales de riñón de rata, de 430 pb, induce la expresión de una conductancia la K^+ cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus*. La cinética de este canal presenta una lenta activación la cual nunca llega a un estado estable, no presentado inactivación incluso en el orden de 100 s. Este canal a pesar de que presenta un peso molecular semejante al obtenido de la fracción H no fue observado este trabajo.

En la presente tesis demostramos también que el mRNA de las MDCK obtenido bajo las condiciones experimentales utilizadas aquí no contiene canales de Cl^- , los cuales, como demostraron Ponce y colaboradores (Ponce y Cerejido, 1991) se encuentran solo en la cara basolateral. Estos resultados, aunados a que se expresaron tres tipos diferentes de canales de K^+ , sugieren que el tratamiento con tripsina-EDTA induce la degradación mayoritariamente de los canales apicales, los cuales como se mencionó arriba son de K^+ , necesitando la célula resintetizarlos. El mRNA de cada fracción obtenida que expresó una conductancia al K^+ puede por tanto ser utilizada para la clonación de los

canales de K^+ que contienen, los cuales si en un futuro se clonan y se demuestra su localización apical podrían servir para comparar su secuencia con otros canales que se sabe se encuentran polarizados en la cara basolateral cuando se expresan en células epiteliales, como recientemente demostraron Trimmer y colaboradores (1993) para canales *DRK1*.

Por último, como se mencionó con anterioridad, las proteínas de membrana, como son los canales iónicos, son por lo general muy difíciles de purificar y aislar. Este problema ha podido ser resuelto mediante el uso de la técnica de expresión en ovocitos. Esta técnica interdisciplinaria, a pesar de que ha permitido la identificación de más de 30 genes que codifican para canales de K^+ y más de un centenar de proteínas de membrana como transportadores o receptores, no se encontraba instalada en México. Uno de los logros de esta tesis fue precisamente el poner a punto esta metodología tan poderosa. Además de ello, nuestros resultados no solo permitieron la caracterización de las corrientes expresadas por el mRNA de las MDCK sino el conocer también el peso molecular de algunos mensajeros específicos de canales de K^+ de estas células, lo que nos permite pensar en utilizar las fracciones que inducen mayor expresión de dichos canales para realizar genotecas de expresión. En estos momentos estamos por adquirir uno de los vectores de expresión más utilizados el cual es el plásmido pSPORT. En este vector podremos clonar el cDNA de los mensajeros de las fracciones, lo que nos permitirá en poco tiempo realizar el *screening* por expresión de la genoteca y así aislar los genes de los canales de K^+ de las MDCK. La secuencia de los marcos abiertos de lectura de los canales podrían ser entonces comparados con secuencias tanto de canales de otros tejidos como de otras proteínas que se encuentran polarizadas apical o basolateralmente buscando señales que posiblemente se encuentren compartidas y que puedan funcionar como tarjetas de identidad que permitan su direccionamiento y por lo tanto su polarización. El análisis de las secuencias de proteínas conocidas distribuidas asimétricamente en ambos polos de la membrana lo hemos recientemente iniciado utilizando bancos de datos, como el GeneBank o el MBL, lo que nos permitirá en un futuro hacer las respectivas comparaciones con las secuencias de los canales de las células MDCK.

VI CONCLUSIONES

1. El sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* establecido en este trabajo es funcional, como se demostró al expresar los canales RCK1 y el Sha2, cuya cinética y amplitud de expresión fue idéntica a lo reportado en la bibliografía.
2. El mRNA poli (A)⁺ extraído de las células MDCK seis horas después de haber sido sembradas a confluencia induce la expresión de tres tipos de corrientes de K⁺ dependientes de voltaje, cada una con diferente cinética y amplitud, cuando se inyecta a ovocitos de *Xenopus*. Estas corrientes son inhibibles por la toxina 4-AP pero no por TEA, además de que presentan una alta selectividad de K⁺ sobre Na⁺. La población de mRNAs obtenida no contiene o bien no presenta cantidades suficientes de mensajeros específicos para canales de Cl⁻, sugiriendo que, debido a que la mayoría de los canales de las MDCK son de K⁺ y que estos son apicales, es probable que los canales expresados sean algunos de los canales apicales de estas células.
3. El fraccionamiento del mRNA por peso evidenció la existencia de al menos tres tipos de canales de K⁺ cada uno con distinto peso molecular. Dichos mensajeros estuvieron contenidos por las fracciones de ~6, 4.5, y 0.4 kb, cuyo peso molecular es muy similar al reportado para algunos canales iónicos que han sido clonados con anterioridad, además de que la cinética de dichos canales reportados es muy similar a la obtenida de la expresión de los mensajeros obtenidos en esta tesis.

VII BIBLIOGRAFIA

- Agnew, WS. Purification of tetrodotoxin-binding component associated with the voltage sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2600-2610. 1978
- Agnew WS. Voltage-regulated sodium channel molecules. *Ann Rev Physiol* 46:517-530. 1984.
- Aguayo LG. Post-Natal Development of K Currents studied in isolated rat pineal cells. *J Physiol (london)* 414:283-300. 1989.
- Aiton JF, Brown CDA, Ogden P, Simmons NL. K transport in tight epithelial monolayers of MDCK cells. *J Membr Biol* 65:99-109. 1982.
- Althoff G, Lill H, Junge W. Proton Channel of the chloroplast ATP synthase, Cfo - Its time -Averaged Single-Channel Conductance as function of pH, Temperature, Isotopic and Ionic medium composition. *J Mem Biol* 108: 263-271. 1989.
- Anderson, JA, Hyprikar, SS, Koehian, LV, Lucas, WJ, Gaber, RF. Functional expresion of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3736-3740. 1992.
- Angelides KJ. Distribution and mobility of ion channels and receptors on nerve cell surfaces. *Horizons in membrane biotechnology* 343:199-212. 1990.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila Slo* locus. *Science* 253:551-555. 1991.
- Baldwin TJ, Tsaur ML, Lopez GA, Jan YN, Jan LY. Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating-sensitive K⁺ channel. *Neuron* 7:471-483. 1991.
- Baraban JM, Snyder SH, Alger BE. Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: electrophysiological effects of phorbol esters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:2538. 1985.
- Barchi RL. Biochemistry of sodium channels from mammalian muscle. In: Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel. Kao CY and Levinson eds. *Ann NY Acad Sci*. 479:1-448. 1986.
- Barchi, RL. Probing the molecular structure of the voltage-dependent sodium channel. *Ann. Rev. Neurosci*. 11: 455-495. 1988.
- Barnard E, Darlison M, Seeburg P. Molecular biology of the GABA_A receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends in Neurosciences*. 10:502-509. 1987.
- Baumann A, Krah-Jentgens I, Müller R, Müller-Holtkamp F, Seidel R, Kecskemethy N, Casal J, Ferrus A, Pongs O. Molecular organization of the maternal effect region of the *shaker* complex of *Drosophila*: Characterization of an IKA channel transcript with homology to vertebrate Na⁺ channel. *EMBO J*. 6:3419-3429. 1987.
- Black JA, Kocsis JD, Waxman SG. Ion channel organization of the myelinated fiber. *TINS* 13:48-54. 1990.
- Blitzer BL, Boyer JL. Cytochemical localization of Na-K-ATPase in the rat hepatocyte. *J Clin Invest*. 62:1104-1108. 1978.
- Block ML, Moody WJ: A voltage-dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. *Science*. 247:1090-1092. 1990
- Bolivar JJ, Cerejido M. Voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol*. 97:43-51. 1987.
- Brown D, Hirsch S, Gluck S. An H⁺-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature*. 331:622-624. 1988.
- Brown D, Sorscher EJ, Ausiello DA, Benos DJ. Immunocytochemical localization of Na⁺ channels in rat kidney medulla. *Am J Physiol*. 256: F366-F369. 1989.
- Caldwell JH, Milton RL. Sodium channel distribution in normal and denervated rodent and snake skeletal muscle. *Journal of Physiology (london)*. 401:145-161. 1988.
- Caplan MJ, Anderson HC, Palade GE, Jamieson JD. Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of (Na⁺, K⁺) ATPase, and endogenous component of MDCK cells baso- lateral plasma membranes. *Cell*. 46:623-631. 1986.

- Catterall, WA. Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels in frog muscle. *J. Gen. Physiol.* 74: 375-391. 1979.
- Catterall WA, Morrow CS, Hartshorne, RP. Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed and detergent solubilized brain membranes. *J. Biol Chem.* 254:11379-11387. 1979.
- Catterall, WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61. 1988.
- Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno, C.A. and Sabatini, D.D. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* 77:853-880. 1978a
- Cereijido M, Rotunno CA, Robbins ES, Sabatini D. Polarized epithelial membranes produced in vitro. In: *Membrane transport processes*, J. Hoffman (ed.). Raven Press, New York, pp. 433-461. 1978b
- Cereijido M, Ehrenfeld J, Meza I, Martinez-Palomo A. Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J Membr Biol.* 52:147-159. 1980.
- Cereijido M, Ehrenfeld J, Fernandez-Castelo S, Meza I. Fluxes, junctions and blisters in cultured monolayers of epithelioid cells (MDCK). *Ann NY Acad Sci.* 372: 422-441. 1981.
- Cereijido M, Robbins ES, Sabatini DD, Stefani E. Cell-to cell communication in monolayers of epithelioid cell (MDCK) as a function of the age of the monolayers. *J Membr Biol.* 81:41-48. 1984.
- Cereijido M, Balda MS, Ponce A, Bolívar JJ. Molecular and Physiological properties of plasma membranes. The role of ion channels. In: *Cell Function and disease*. Ed LE Cafredo, LE Todd, L Packer and J Jaz. Plenum Publishing Corp. 1988.
- Cereijido M, Ponce A, Gonzalez-Mariscal L. Tight Junctions and Apical/Basolateral Polarity. *J. Mem. Biol.* 110, 1-9. 1989a. 1989.
- Cereijido M, Contreras RG, Gonzalez-Mariscal L. Development and alteration of polarity. *Ann Rev Physiol* 51: 785-795. 1989b.
- Chandy, KG, Williams, CB, Spencer, RH, Aguilar, BA, Ghanshani, S, Tempel, B, Gutman, GA. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. *Science* 247:973-975. 1990.
- Chomczynski, P, Sacchi, N. . *Anal. Biochem.* 162: 156-159. 1987
- Christie, MJ, Adelman J, Douglass M, North RA. Expression of a cloned rat brain potassium channel in *Xenopus* oocytes. *Science.* 244:221-224. 1989.
- Christie, MJ, North RA, Osborne J, Douglass M, Adelman, J. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 4:405-411.1990.
- Coats, WD Jr, Navarro, J. Cloning a Human dopamine transporter. *J. Biol. Chem.* 265:5964.1990
- Colman A. Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. In: *Transcription and translation. a practical approach*. Hames Bd, Hihggins SJ ed. 10:271-310. IRL press. 1987.
- Contreras RG, Avila G, Gutierrez C, Bolivar JJ, Gonzalez-Mariscal L, Darszon A, Beaty G, Rodriguez-Boulan E. Cereijido M. Repolarization of Na-K-Pumps during establishment of epithelial monolayers. *Am J Physiol.* 257:C896-905. 1989.
- Connor JA, Stevens CF. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol.* 213: 31-53. 1971b
- Connor JA. Slow repetitive activity from fast conductance changes in neurons. *Fed Proc* 37: 2139-2145. 1978.
- Cota G, Hiriart M, Horta J, Torres-Escalante JI. Calcium channels and basal prolactin secretion in single male lactotropes. *Am J Physiol.* 259 (Cell Physiol 28): C949-C959. 1990
- Cui F, Mandel G, DiFrancesco D, Klines RP, Pennefather P, Dwyer NB, Haspel HC, Cohen IS. Expression and characterization of a canine hippocampal inwardly rectifying K⁺ current in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 457: 229-246. 1992.
- Curtis, BM, Catterall, WA, Purification of the calcium antagonist receptor of voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23: 2113-2118. 1984.
- Darszon A, Liévano A, Sánchez JA. Single channel recording from bilayer derived from isolated sea urchin plasma membranes. *Biophys. J.*

45:308a. 1984.

Darszon A, García-Soto J, Liévano A, Sánchez JA, Islas-Trejo AD. Ionic channels in the plasma membrane of sea urchin sperm. In: Ionic channels in cells and model systems. Ed. Ramon Latorre. Plenum Press. 1986.

Desir GVHA, Hamlin E, Puente RF, Reilly F, Hildebrandt, Igarashi P. Isolation of putative voltage-gated epithelial K⁺ channel isoforms from rabbit kidney and LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol* 31:F151-F157. 1992.

Desnuelle P. Intestinal and renal aminopeptidase: A model of a transmembrane protein. *Eur J Biochem.* 101:1-11. 1979.

Deutsch C. K channels and mitogenesis. In: Potassium channels: Basic function and therapeutic aspects, ed. T. Colatsky. Alan R Liss Inc. NY. 1988.

Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* 136:153-180. 1970.

Durrel, SR, Guy, R. Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J.* 62:238-250. 1992.

Dwivedy AK. Density of sodium channels in insect synaptic nerve endings. *Neurochemistry international.* 17:467-474. 1990.

Eisen, G, Dani, J A. An introduction to molecular architecture and permeability of ion channels. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 205-226. 1987.

Erxleben. Stretch-activated current through single ion channels in the abdominal stretch receptor organ of the crayfish. *J. Gen. Physiol.* 94: 1071-1083. 1989.

Field M, Greenspan NR, Sullivan SK, Swamy K. Phorbol myristate acetate (PMA) inactivates an epithelial potassium channel from flounder intestine expressed by *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 48:23p. 1989.

Frech GC, Joho RH. Isolation of ion channel genes by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Methods in Enzymology* 207, 592-604. 1992.

Frech GC, Vandongen AMJ, Schuster G, Brown AM, Joho RH. A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature* 340:642-645 1989.

Friedrich F, Paulmichl M, Kolb HA, Lang F. Inward Rectifier K channels in renal epitheloid cells (MDCK) activated by serotonin. *J. Membr. Biol.* 106:149-155. 1988.

Friedrich F, Weiss H, Paulmichl M, Lang F. Activation of potassium channels in renal epitheloid cells (MDCK) by extracellular ATP. *J. Am. Physiol.* 256 (Cell Physiol. 25) C1016-C1021. 1989.

Galli P, Brenna A, De Camilli P, Meldolesi J. Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic acinar cells. *Exp Cell Res.* 99:178-183. 1976.

Gmaj P, Murer H, Kinne K. Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex. *Biochem J.* 178:253-256. 1979.

Gottlieb E. Messenger RNA transport and localization. *Current Opinion in Cell Biology.* 2:1080-1086. 1990.

Gray PTA, Buvan S, Ritchie JM. High conductance anion selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc London.* B221:395. 1984.

Green R, Meiss HK, Rodriguez-Boulan E. *J. Cell Biol.* 89:230. 1981

Gunning R. Increased numbers of ion channels promoted by an intracellular second messenger. *Science* 235:80-82. 1987.

Hartshorne RP, Keller BU, Talvanheimo JA, Caterall WA, Montal M. Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:240. 1985.

Henderson, R, Wang, JM, Solubilization of a specific tetrodotoxin-binding component from garfish olfactory nerve membrane. *Bochemistry* 11; 4565-4569. 1972

Henry JP, Chich JF, Goldsmidt D, Thieffry M. Ionic mitochondrial channels - Characteristics and possible role in protein translocation. *Biochimie.* 71: 963-968. 1989.

Hesketh E, Pryme IF. Interaction between mRNA, ribosomes and cytoskeleton. *Biochem J.* 277:1-10. 1991.

- Hille B. Ion channel of excitable membranes. Second edition . Sinauer Associates Inc., 1992
- Hoger JH, Rudy B, Lester HA, Davidson N. Characterization of maintained voltage-dependent K-Channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *Molecular Brain Research*. 10:1-11. 1991.
- Honoré E, Attali B, Romey G, Lesage F, Barhanin J, Lazdunski M. Different types of K⁺ channel current are generated by different levels of a single mRNA. *Embo J*. 7:2465-2471. 1992.
- Isacoff E, Jan YN, Jan LY. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *xenopus* oocytes. *Nature* 343:530-534. 1990.
- Iverson LE, Rudy B. The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the Shaker gene of *Drosophila*. *J. Neurosci*. 10:2903-2916. 1990.
- Iverson LE, Tanouye, A, Lester, HA, Davidson, N, Rudy, B. A-type potassium channel expressed from *Shaker* locus cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 5723-5727. 1988.
- Jan LY, Jan YN. A superfamily of ion channels. *Nature* 345:672. 1990.
- Jan LY, Jan YN. Tracing the roots of ion channels. *Cell*. 69: 715-718. 1992.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348:510-514. 1990.
- Kamb, A, Iverson L, Tanouye MA. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50: 405-413. 1987.
- Kamb, A., L. Tseng-Crank, Tanouye MA. Multiple products of the *Drosophila* Shaker gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron* 1:421-430.1988
- Kaplan, WD, Trout III, WE. The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* 61:399-409. 1969.
- Kaupp BU, Niidome T, Tanabe T, Terada S, Boningk W, Numa S. (1989). *Nature* 342:762-766. 1989.
- Keller F, Hanke W, Trissl D, Bakkergrunwald T. Pore-forming protein from *Entamoeba-Hystolitica* forms voltage-controlled and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates. *Biochemical Biophysical Acta*. 982: 89-93. 1989.
- Kerjaschki D, Noronha-Blob L, Sacktor B, Farquhar MG. Microdomains of distinctive glycoprotein composition in the kidney proximal tubule brush border. *J Cell Biol*. 98:1505-1513. 1984.
- Kidokoro Y. Spontaneous Ca action potentials in a clonal pituitary cell line and their relation to prolactin secretion. *Nature* 258: 741-742. 1975.
- Kinally KW, Tedesci H, Mannella CA. Evidence for a novel voltage-activated channel on the outer mitochondrial membrane. *FEBS letters*. 226:83-87. 1987.
- Kinne R, Murer H, Kinne-Saffran E, Thees J, Sach G. Sugar transport by renal plasma membrane vesicles: characterization of the system in the brush-border microvilli and basolateral plasma membranes. *J Membr Biol*. 21:375-395. 1975.
- Koefoed-Johnsen V, Ussing HH: The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand*. 42:298-308. 1958.
- Kolb HA, Brown CDA, Murer H. Identification of a voltage-dependent anion channel in the apical membrane of a Cl-secretory epithelium (MDCK). *Pflugers Arch*. 403:262-265. 1985.
- Kolb HA, Paulmichl M, Lang F. Epinephrine activates outward rectifying K⁺ channel in Madin-Darby canine kidney cells. *Pflugers. Arch*. 408:584-591. 1987.
- Konishi T. Voltage dependent potassium channels in mouse schwann cells. *J. Physiol Ion*. 411:115-130. 1989.
- Kubo Y. Development of ion channels and neurofilaments during neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma cell lines. *J Physiol Lond*. 409: 497-523. 1989.
- Kubo Y, Baldwin T, Jan YN Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-132. 1993.

- Kushner L, Lerma J, Bennett MVL, Zukin RS. Using the *Xenopus* oocyte system for expression and cloning of neuroreceptors and channels. *Methods in Neuroscience*. 1:3-29. 1989
- Lamb JF, Ogden P, Simmons NL. 1981. Autoradiographic localization of 3H-Ouabain bound to cultured epithelial cell monolayers of MDCK cells. *Biophys Acta*. 644:333-340. 1981.
- Landry DW, Reitman M, Cragoe EJ (Jr) Al-Awqati Q. Epithelial chloride channel: Development of inhibitory ligands. *J Gen Physiol* 90:779. 1987.
- Lang F, Defregger M, Paulmichl M. Apparent chloride conductance of subconfluent Madin Darby canine kidney cells. *Pflugers Arch*. 407:158-162. 1986.
- Lang F, Friedrich F, Paulmichl M, Schobersberger W, Jungwirth A, Ritter M, Steidl M, Weiss H, Wil E, Tschernko E, Paulmichl R, Hallbrucker C. Ion channels in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Renal Physiol Biochem*. 13:82-93. 1990.
- Latorre R, Miller C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* 71:11-20. 1983.
- Lesage F, Attali B, Lazdunski M, Barhanin J. Developmental expression of voltage-sensitive K⁺ channels in mouse skeletal muscle and C₂C₁₂ cells. *FEBS Lett* 310:162-166. 1992.
- Levinson, SR and Ellory JC. Molecular size of tetrodotoxin binding site estimated by irradiation inactivation. *Nature, New Biol*. 245: 122-123. 1973.
- Levitan IB. Modulation of ion channels in neurons and other cells. *Ann Rev Neurosci*. 11:119-136. 1988.
- Lewis SA, Eaton DC, Diamond JM. The mechanism of Na⁺ transport by rabbit urinary bladder. *J Membr Biol*. 28:41-50. 1976.
- Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulant E: Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:9557-9561. 1980.
- Louvard D, Apical membrane aminopeptidase appears at sites of cell-cell contact in cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:4132-4136. 1980.
- Mackinnon D. Isolation of cDNA clone coding for a putative second potassium channel indicates the existence of a gene family. *J. Biol. Chem.*: 264:8230-8236. 1989.
- Mackinnon D, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated potassium channels. *Science* 250:276-279. 1990.
- Mackinnon R, Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-gated potassium channel. *Nature* 350:232-235. 1991.
- Madin SH, Darby NB. As cataloged in the American type culture collection catalog of strains 2:574. 1958.
- Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA. Phorbol esters block a voltage sensitive chloride current in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 321: 695-670. 1986.
- Malenka RC, Madison DV, Andrade R, Nicoll RA. Phorbol esters mimic some cholinergic actions in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*. 6:475. 1986.
- Marks AR, Tempst P, Hwang K, Inui M, Chadwick C, Fleischer S, Nadal-Ginard B. Molecular cloning of calcium release channel cDNA from sarcoplasmic reticulum. In. *Molecular Biology of the cardiovascular system*. pp 29-40. Alan R. Liss Inc. 1990.
- Matsubara, H, Liman ER, Hess P, Koren G. Pretranslational mechanisms determine the type of potassium channels expressed in the rat skeletal and cardiac muscles. *J. Biol. Chem*. 266: 13324-13328. 1991.
- McCormack K, Lin JW, Rudy B. Shaker K channel subunits form heteromultimeric channels with novel functional properties. *Biochemical and Biophysical Researc Comm*. 171(3):1361-1371. 1990.
- Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol*. 98:991-1000. 1984.
- Mills JW, Ernst SA. Localization of sodium pump sites in frog urinary bladder. *Biochem Biophys Acta*. 375:268-273. 1975.

- Mills JW, Ernst SA, Di Bona DR. Localization of Na⁺ pump sites in frog skin. *J Cell Biol.* 73:88-110. 1978
- Moody WJ, Bosma MM. A nonselective cation channel activated by membrane deformation in oocytes of the ascidian *Boltenia villosa*. *J Mem Biol.* 107:179-188. 1989.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of humangenomic DNA encoding a novel protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 176-181. 1989.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kykiotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. Primary structure of alpha subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299: 793-797. 1982.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikyotani S, Furutani Y, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. Structural homology of *Torpedo* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302: 528-532. 1983.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Tayashida H, Miyata T, Numa S. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127, 1984.
- Noda M, Ikeda T, Kayano T, Susuki H, Takeshima H, Kurasaki M, Takahashi H, Numa S. Existence of distinct Na channel mRNA in rat brain. *Nature* 320: 188-192, 1986.
- Numa, S. A molecular view of neurotransmitter receptors and ion channels. *Harvey lect.* 83:121-165. 1989.
- Ojakian GK, Schwimmer R. The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 107:2377-2387. 1988.
- Palmer LG, Frindt G. Amiloride-sensitive channels from the apical membrane of the rat cortical collecting tubule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:2767. 1986.
- Palmer LG, Frindt G. Conductance and Gating of epithelial Na Channels from Rat cortical collecting tubule. *J Gen Physiol.* 92: 121-138. 1988.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753. 1987.
- Parcej D, Dolly O. Dendrotoxin acceptor from bovine synaptic plasma membranes. *Biochem J* 257: 899-903. 1986.
- Partridge LD, Swandulla D. Calcium activated non-specific cation channels. *Trends in Neurosciences.* 11(2):69-72. 1988.
- Paulmichl M, Li Y, Wickmann K, Ackerman M, Peralta E, Clapham D. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356: 238-241. 1992.
- Perney, MT, Kaczmarek. KL. Expression and regulation of mammalian K⁺ channel genes. *Seminars in The Neurosci.* 5:135-145. 1993.
- Peter AB, Schittny JC, Niggli V, Reuter H, Siegel E. The polarized distribution of poly(A)⁺-mRNA-induced functional ion channels in the *Xenopus* oocyte plasma membrana is prevented by anticytoskeletal drugs. *J Cell Biol* 114:3 455-464. 1991.
- Ponce A, Cerejido M: Polarized distribution of cation channels in epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 1:1-13. 1991.
- Ponce A, Contreras G, Cerejido M. Polarized distribution of chloride channels in epithelial cells. *Cell Physiology and Biochemistry.* 1: 160-169. 1991a.
- Ponce A, Bolivar JJ, Vega J, Cerejido M. Synthesis of plasma membrane and potassium channels in epithelial (MDCK) cells. *Cell Physiology and Biochemistry.* 1: 195-204. 1991b.
- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 7: 1087-1096, 1988.
- Pongs O, Shaker related K channels. *Seminars in The Neurosci.* 5:93-100. 1993.
- Quinton PM, Tormey JM. Localization of Na/K ATPase sites in the secretory and reabsorptive epithelia of perfused exocrine sweat glands: A question as to the role of the enzyme in secretion. *J Membr Biol.* 29:383-399. 1973.

- Rabito CA, Karich MV. Polarized aminoacid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK1) the apical system. *J Biol Chem* 258:2543-2547. 1983.
- Rabito CA, Ausiello DA. Na^+ - dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney. *J Membr Biol* 54:31-38. 1980.
- Rae JL, Levis RA. Patch voltage clamp of lens epithelial cells: Theory and practice. *Mol Physiol*. 6:115-125. 1984.
- Ramashwami M, Gautam M, Kamb AA, Rudy B, Tanouye MA, Mathew MK. Human potassium channels genes: molecular cloning and functional expression. *Mol Cell Neurosci*: 1:214-223. 1990.
- Rane SG, Dunlap K. Kinase C activator 1,2-oleoylacylglycerol attenuates voltage dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 83:184. 1986.
- Rehm H, Lazdunski M. Purification and subunit structure of a putative potassium channel protein identified by its binding properties for Dendrotoxin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:4919-4923. 1988.
- Reik L, Petzold GL, Higgins JA, Greengard P, Bannet RJ. Hormone sensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver. *Science* 168:382-386. 1970.
- Retting J, Wunder F, Stocker M, Lichtinghagen R, Mastiaux F, Beckh S, Kues W, Pedarzani P, Schroeter KH, Ruppertsberg JP, Veh R, Pongs O. Characterization of a Shaw-related potassium channel family in the brain. *EMBO J* 11:2473-2486. 1992
- Ribera AB, Spitzer NC. Developmental regulation of potassium channels and the impact on neuronal differentiation. In "Ion Channels" volume 3. Toshio Narahashi ed. Plenum Press, New York, 1992.
- Riordan, J. R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenzki, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M. L., Lannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.-C. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073. 1989.
- Rodriguez-Boulan E. Membrane biogenesis, envelope RNA viruses and epithelial polarity. In: *Modern Cell Biology*. B. Stair, editor. pp 119-170. Alan Liss, New York. 1983.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K.T. and Sabatini, D.D. Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby Canine Kidney Cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J. Cell Biol*. 96:866-874. 1983.
- Romey G, Hugues M, Schmidt-Antomarchi H, Lazdunski M. Apamin: A specific toxin to study a class of Ca dependent K channels. *J Physiol (Paris)*. 79:259. 1984.
- Rosenthal W, Schultz G. Modulations of voltage-dependent ion channels by extracellular signals. *TIPS*. 8:sp. 1987.
- Roth MG, Gundersen D, Patil N, Rodriguez-Boulan E. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *J Cell Biol*. 104:769-782. 1987.
- Rudy, B, Sen K, Vega-Saenz De Miera E, Lau D, Ried, T, Ward DC. Cloning of a human cDNA expressing a high voltage activating, TEA sensitive, Type-A K^+ channel which maps to chromosome 1 band p21. *J. Neurosci. Res*. 29:401-412. 1991.
- Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 104:57-60. 1991.
- Sachs F, Sokabe M. Stretch-activated ion channels and membrane mechanics. *Neuroscience Research*. 12:S1-S4. 1990.
- Sackin H. A stretch-activated K^+ channel sensitive to cell volume. *Proc Natl Acad Sci*. 86: 1731-1735. 1989.
- Sanchez-Olea G, Pasantes-Morales H, Lazaro A, Cerejido M: Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol* (in press).
- Schroeder J, Raschke K, Neher E. Voltage dependence of K channels in guard-cell protoplasts. *Proc Natl. Acad. Sci*. 84: 4108-4112, 1987.
- Schwartz IL, Shlatz LJ, Kinne-Saffran E, Kinne R. Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of antidiuretic hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 71:2595-2599. 1974.
- Siegelbaum SA, Camardo JS, Kandel ER. Serotonin and cAMP close single K channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature* 299:415. 1982.

- Simoncini L, Moody WJ. Changes in voltage-dependent currents and membrane area during maturation of starfish oocytes: species differences and similarities. *Dev Biol.* 138: 194-201. 1990.
- Sly W, In *The Glycoconjugates*, M.I. Horowitz ed. (Academic Press, New York, 4:3-25. 1982.
- Solc, CK, Zagotta, WN, Aldrich, RW. Single channels and genetic analysis reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science* 236: 1094-1098. 1987.
- Sorgato MC, Keller BU, Stuhmer W. Patch clamping of the inner mitochondrial membrane reveal a voltage-dependent ion channel. *Nature.* 330:498-500. 1987.
- Spiegel S, Blumenthal R, Fishman PH, Handler JS. Gangliosides do not move from apical to basolateral plasma membrane in cultured epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 821:310-318. 1985.
- Stefani E, Cerejido M. Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK). *J. Mem. Biol.* 73:177-184. 1983.
- Stocker, M, Stümer, W, Wittka, R, Wang, S, Müller, R, Ferrus, A, Pongs, O. Alternative *Shaker* transcripts express either rapidly inactivating and no inactivating K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:8903-8907. 1990.
- Stühmer W, Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, Perschke A, Baumann A, Pongs O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 8:3235-3244. 1989.
- Talavera DA. Papel del calcio y de los contactos celulares en la restauración de la conductancia al potasio y de la superficie de membrana en células epiteliales cultivadas. Tesis de Maestría en Fisiología y Biofísica. CINVESTAV, México, 1993.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242:1042-1045. 1988.
- Taylor Z, Emmanouel DS, Katz AI. Insulin binding and degradation by luminal and basolateral tubular membranes from rabbit kidney. *J Clin Invest* 69:1136-1146. 1982.
- Tempel B, Papazian D, Schwarz T, Jan YN and Jan L. Sequence of a probable potassium channel component encoded at the *shaker* locus of *Drosophila*. *Science* 237: 770-775. 1987.
- Thiemann A, Gründer S, Push M, Jentsch TJ. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57-60. 1992.
- Timpe, LC, Jan, YN, Jan, L.Y. Four cDNA clones from *Shaker* locus of *Drosophila* induce kinetically distinct A-type potassium currents in *Xenopus* oocytes. *Nature.* 332: 837-839. 1988a.
- Timpe, LC, Schwarz, TL, Tempel, BL, Papazian, DL, Jan, YN, Jan, L.Y. Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature.* 331: 143-145. 1988b.
- Trimmer JS, Agnew WS. Molecular diversity of voltage-sensitive Na channels. *Ann. Rev. Physiol.* 51:401-418 1989.
- Trimmer JS, Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K⁺ channel polypeptide in rat brain. *Proc. Natl Acad Sci USA* 88:10764-10768.1991.
- Trimmer JS, Arreaza MG, Brown MA, Halegoua S, Marrion NV, Brehm P, Keinklaus AK. Targeting of wild type and mutant DRK1 K⁺ channel polipeptides in polarized and non polarized mammalian cells. *Neurosci (Abstr)* 18: 1094. 1992.
- Trimmer JS, Martin K, Hockfield S, Agnew WS, Lenn NJ. Expression of Kv2.1 K⁺ channel isoforms in developing and adult rat brain. *J. Neurosci.* 3: 1051-1058. 1993.
- Tseng-Crank JCL, Tseng GN, Schwartz A, Tanouye MA. Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from rat cardiac library. *FEBS.* 268(1):63-68. 1990
- Tyler A, Monroy A, Kao C, Grundfest H. Membrane potential and resistance of the starfish egg before and after fertilization. *Biol. Bull.* 11: 153-177. 1956.
- Valentich JD: Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Ann NY Acad Sci.* 372:394-405. 1981.

- Valdivia H, Smith JS, Martin BM, Coronado R, Possani LD. Charybdotoxin and Noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of $K^+(Ca^{2+})$ channel. FEBS letters. 22:284. 1987.
- Van Meer G, Simmons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. EMBO J. 5:1455-1464. 1986.
- Van Meer G, Van't Hof W, Van Genderen I: Tight junctions and polarity of lipids. In Cereijido M (ed): The Tight Junctions. CRC Press, 1991.
- Vega-Salas DE, Salas PJI, Rodriguez-Boulan E. Exocytosis of vacuolar apical compartment (VAC): a cell-cell contact controlled mechanism for the establishment of the apical plasma membrane domain in epithelial cells. J Cell Biol. 107:1717-1728. 1988.
- Vega-Salas DE, Salas PJI, Rodriguez-Boulan E. Formation of the apical pole of epithelial (Madin -Darby canine kidney) cell: Polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. J Cell Biol 104:905-916. 1987.
- Vega-Saenz de Miera E. Chiu N, Sen K, Liu, JW, Rudy B. Towards an understanding of the molecular composition of K^+ channels: Products of at least nine distinct shaker family K^+ channels genes expressed in a single cell. Biophys J 59:197a. 1991
- Velasco G, Prieto M, Alvarez-Riera J, Gascon S, Barros F: Characteristics and regulation of a high conductance anion channel in GBK kidney epithelial cells. Pflgers Arch. 414:304-310. 1989.
- Wolfram S, Giering H, Scharrer E. Na^+ - gradient dependence of basic aminoacid transport into rat intestinal brush border membrane vesicles. Comp Biochem Physiol. 78A:475-480. 1984.
- Wu, C-F., Haugland, FN. Voltage clamp analysis of membrane currents in larval muscle fibers of *Drosophila*: alteration of potassium currentes in Shaker mutants. J. Neurosci. 5:2626-2640, 1989.
- Yokoyama S, Imoto K, Kawamura T, Higashida H, Iwabe N, Miyata T, Numa S. Potassium channels from NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. FEBS lett. 259: 37-42. 1989.
- Zeiger E, Moody W, Hepler P, Varela F. Light-Sensitive membrane potentials in onion guard cells. Nature 270: 270-271. 1977.