

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN
CANAL DE POTASIO RECTIFICADOR
ENTRANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADAO ACADÉMICO DE

**MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

SILVIA IVONNE MORA HERRERA

DIRECTORA DE TESIS.

Dra. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PEREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Caracterización Funcional de un Canal de Potasio Rectificador Entrante

**(Identificación de los Sitios de Unión al Ba²⁺
Externo en un Canal de Potasio Kir 3)**

Este trabajo se desarrollo bajo la Dirección de la
Dra. Laura Escobar Pérez, en el Departamento
de Fisiología de la Facultad de Medicina de la
U.N.A.M.

El financiamiento para realizar esta investigación
fue proporcionado por:

DEGAPA

IN208196, IN220199

CONACYT

30570-M

A mis Queridos Hermanos.

Martha y Jorge,
por tolo lo bueno que aprendí de ustedes.
Leticia.
gracias por hacerme reflexionar.
Javier, Cesar y Beatriz (Bere).
por su amor y todos los momentos que
hemos pasado juntos
Poncho,
por tus enseñanzas y consejos.
Fernando y Xochitl.

A mis Sobrinitos

Helenita,
Eugeniux,
Lauris,
Fernandito,
mi tremenda Pau,
Alicia,
Julio,
y el mas pequeño Javircito.
a todos los quiero mucho.

A mis Viejas y a mis Compadres

Lucy, Lety, Rosángela, Lucia, Angelica,
Jeny, Ely, Alma, Lalo y Javier
por su amistad y apoyo.

A mis amiguitos

Caro, Julio, Hilda, Lety, Tony, Noemí y Mony

A Javier González Damián.

Eres la persona más maravillosa
que Dios ha puesto en mi camino.
Gracias amor por aguantar mis
locuras, enojos, regaños y por cada
momento de la vida que paso
contigo

A mis Padres

José Guadalupe Mora Sánchez †

Tú no te haz marchado siempre
haz permanecido a nuestro lado

Delfina Herrera Villa

Gracias por todo el amor y
ternura que nos entregas día
con día, y por enseñarnos a
amar y tener fe.

Verónica Damián Gómez

Alfonso González Chavarria.

No tengo palabras para agradecer
su amor, confianza y el apoyo
incondicional que me han y
siguen brindándome.

AGRADECIMIENTOS.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Laura Escobar por su apoyo, confianza y dirección en la realización de este trabajo de tesis.

Al jurado asignado

Dr. Gerardo Gamba Ayala
Dr. Martín Martínez Rosas.
Dr. David Erasmo García D.
Dr. Luis Alfonso Vaca D.
Dr. José Ma. Farías Sanchez.
Dra. Laura Ma. Ongay Larios.
por la atención brindada en la
revisión de este trabajo, así
como, sus valiosos comentarios
y sugerencias.

Nallely Cabrera González
por su ayuda y orientación en la
técnica de las mutantes.

Dr. Roberto Coria
por su ayuda en el análisis de alineamiento

A todos mis profesores.

Al Dr. Martín Martínez
del Instituto Nacional De
Cardiología "Ignacio Chávez", por
su valiosa ayuda y orientación en
la parte electrofisiológica de este
trabajo

Al Dr. José Ma. Fariñas
del Instituto Nacional De
Cardiología "Ignacio Chávez"
gracias por todo.

INDICE

Resumen	i
1. Introducción	1
2. Tipos de Canales de Potasio	2
2.1 Canales de Potasio Dependientes de Voltaje	3
2.2 Canales de Potasio Rectificadores entrantes	4
2.2.1 Clasificación	6
2.2.2 Estructura de los Canales Kir	8
2.2.3 El Poro	9
2.2.4 La subfamilia Kir 3	9
2.2.5 El Canal Kir 3.5 Clonado de los Ovocitos de la Rana <i>Xenopus laevis</i>	10
3 Antecedentes	12
3.1 Bloqueo de la Corriente por Ba ²⁺ Externo	12
3.2 Justificación	17
4 Objetivo General	18
4.1 Objetivo Particular	18
4.2 Hipótesis	18
5. Métodos Biología Molecular	19
5.1 Mutagénesis Dirigida y Recombinación por PCR	19
5.2 Clonación	19
5.2.1 Ligación	20
5.2.2 Transformación	20
5.2.3 Secuenciación	21
5.3 Transcripción <i>in vitro</i>	24
6. Métodos Electrofisiología	25
6.1 Obtención de los Ovocitos	25
6.2 Obtención de los Registros	25
6.3 Análisis de los Registros	26
7. Resultados Biología Molecular	27
7.1 Obtención de los Fragmentos mutados N129E y K157E	27

7.2 Clonación de los Canales Mutados N129E y K157E	31
7.2.1 Purificación de los Canales Mutados	32
7.2.2 Secuenciación de los Canales.	34
7.3 Transcripción <i>in vitro</i>	37
8. Resultados Electrofisiología	38
8.1 Expresión funcional de los canales	38
8.2 Sensibilidad de los canales al Bloqueo de la Corriente Inducido por Ba ²⁺ Externo	38
8.2.1 Relación Corriente-Tiempo	38
8.2.2 Inactivación de la Corriente	40
8.2.3 Relación Corriente-Voltaje.	43
8.3 Obtención de la Kd	46
8.3.1 Kd al Inicio del Pulso	46
8.3.2 Kd al Final del Pulso	49
9. Discusión Biología Molecular	52
9.1 Obtención de los Canales Mutados	52
9.2 Clonación de los Canales Mutados	54
10 Discusión Electrofisiología	55
10.1 Expresión Funcional de los Canales	55
10.2 Rectificación e Inactivación	56
10.3 La Mutación N157E Afecta el Bloqueo de la Corriente inducido por Ba ²⁺ externo.	56
11. Conclusiones	60
Literatura citada	61
Anexo I	67
Anexo II	69
Anexo III	71

RESUMEN

El objetivo principal de éste trabajo consistió en probar si dos sitios que acotan la región del poro externo de un canal de potasio Kir 3.5 afectan la sensibilidad de la corriente al bloqueo inducido por Ba^{2+} externo. Para lo anterior mediante la técnica de mutagénesis dirigida y recombinación por PCR se obtuvieron los dos canales mutantes a los cuales se les mutó a un aminoácido cargado negativamente (N129E y K157E). Para probar si el cambio de aminoácido aumentó la sensibilidad al Ba^{2+} externo, se realizó la transcripción *in vitro* y el RNAm se inyectó a ovocitos de la rana *Xenopus laevis* como sistema de expresión. Los ensayos de sensibilidad al bloqueo de la corriente inducida por el bloqueo de Ba^{2+} externo, se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltaje-clamp) variando las concentraciones de Ba^{2+} en la solución de baño con alto potasio. La mutante N129E no mostró expresión funcional, mientras que la mutante K157E y el canal silvestre presentaron niveles de expresión suficientes para realizar los ensayos. Al analizar nuestros resultados se encontró que efectivamente la sensibilidad al Ba^{2+} de la mutante K157E fue mayor respecto al canal silvestre.

1. INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática es crucial en la vida de las células, ya que actúa como una barrera separando los componentes del citosol y del ambiente extracelular (Albert, 1994). Las membranas biológicas se constituyen por una bicapa lipídica hidrofóbica, selectivamente permeable, la cual permite mantener niveles diferentes de componentes internos y externos indispensables para su metabolismo (Albert, 1994; Becker, et al., 1996). Las membranas contienen además proteínas integrales cuya función es muy variada. Las proteínas de membrana involucradas sólo en el transporte se clasifican en: transportadores, bombas y canales iónicos. Los receptores actúan como sensores de señales externas, mientras que los transportadores permiten el paso de sustancias hidrosolubles que no pueden atravesar la barrera lipídica, y que son indispensables para la célula, por ejemplo: la glucosa, los aminoácidos y los iones (Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- ; Albert, 1994; Becker, et al., 1996).

Los transportadores unen determinadas sustancias (como glucosa, iones, y péptidos) del medio extracelular para liberarlas hacia el lado opuesto; este movimiento siempre es a favor del gradiente de concentración y no involucra gasto energético (Albert, 1994). Existen tres tipos de transportadores: los "uniporter" transportan sólo una sustancia a favor de su gradiente de concentración; los "simporter" o cotransportadores transportan dos sustancias en una misma dirección y los "antiporter" o intercambiadores generalmente transportan dos sustancias pero en direcciones opuestas (Albert, 1994; Becker, et al., 1996).

En el transporte activo se transportan sustancias (iones, péptidos) en dirección contraria al gradiente de concentración e involucra gasto energético (hidrólisis de ATP) Es un transporte mediado por ATPasas (bombas de Na^+ - K^+ ; H^+ -peptido; Ca^{2+}) cuya función principal es la de mantener el volumen celular y recuperar el potencial de membrana (Albert, 1994, Becker, et al., 1996)

Los canales iónicos son componentes cruciales en la actividad de las células. Son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de ciertos iones a través de la membrana plasmática impulsados por sus gradientes electroquímicos (Aidley y Standfield, 1996). En la naturaleza se encuentran una gran diversidad de canales presentes en todo tipo de células (procarióticas y eucarióticas). Estos participan en procesos como la memoria, el ritmo cardiaco, la integración neuronal, la locomoción y la excitabilidad celular. Se ha observado que los componentes funcionales de los canales iónicos son: el poro acuoso (H5; por el cual fluyen los iones), el filtro de selectividad localizado en el poro (identifica al ión permeable) y la compuerta de inactivación (limita el flujo de iones). Estos canales se han clasificado con base en el tipo de ión que difunden (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Cl^-) y en el estímulo que causa su apertura (cambios en el potencial de membrana, ligandos etc; Hille, 1992).

En los últimos años se han podido clonar diversos genes que codifican para canales iónicos, lo que ha permitido deducir su secuencia primaria de aminoácidos, estructura y conformación en la matriz lipídica. Se han utilizado sistemas de expresión heterólogos, como el de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, en los cuales se inyecta con una micro pipeta el RNA mensajero (mRNA) sintetizado *in vitro*, que codifica para un cierto canal iónico. A través de mutaciones y deleciones en los canales iónicos se ha observado cómo se alteran sus propiedades, dando a conocer qué partes de su secuencia de aminoácidos son las responsables de los distintos componentes funcionales, como son: el poro acuoso, el sensor de voltaje y la compuerta de inactivación (Hille 1992).

2 TIPOS DE CANALES DE POTASIO

Los canales de K^+ son un grupo de proteínas ubicuas y extremadamente diversas. La mayoría de las células que han sido analizadas electrofisiológicamente

expresan al menos un tipo de corriente de K^+ (Swanson, 1993). Estas proteínas regulan varios aspectos de las función celular como son:

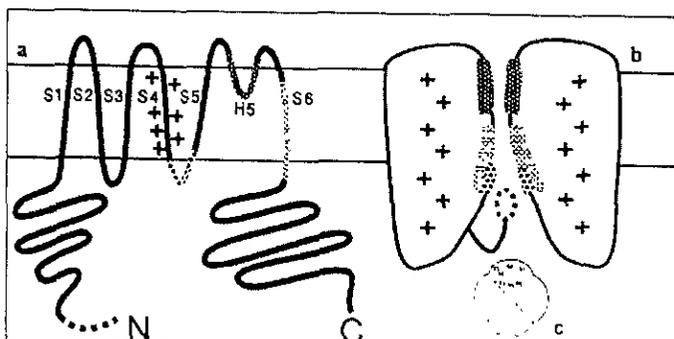
- El flujo de K^+
- El volumen celular
- La liberación de hormonas y transmisores
- El potencial de reposo.
- La excitabilidad neuronal y muscular.

A su vez son activados por cambios en el potencial de membrana, por diferentes estados metabólicos de la célula, hormonas, iones, neurotransmisores y segundos mensajeros (Hille, 1992).

La clonación de los genes que codifican para los canales de K^+ ha permitido la identificación de dos grandes familias, la de los canales de K^+ dependientes de voltaje y la de los canales de K^+ rectificadores entrantes.

2.1 Canales de Potasio Dependientes de Voltaje (Kv).

Estos canales iónicos son activados por la despolarización de la membrana celular. Participan en la regulación de los diversos procesos celulares como son: la excitabilidad celular, la secreción y la duración del potencial de acción (Hille 1992,



Esquema 1 Figura que esquematiza un canal de K^+ dependiente de voltaje a) muestra los 6 segmentos transmembranales, b) muestra el bloqueo del canal (hipótesis de la bola y la cadena) c) muestra la conformación tetramérica (a y b, tomadas de Jan y Jan 1997, c. Kubo et al 1993)

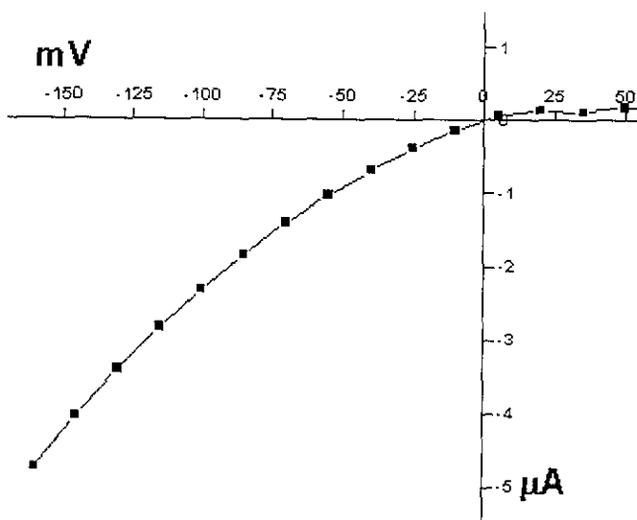
Jan y Jan 1997). Una proteína que estructura un canal de potasio funcional se encuentra formada por cuatro subunidades α (tetramero; Pongs, 1993; esquema 1c), en la cual cada una se compone de 6 segmentos transmembranales denominados S1 hasta S6 (Fig.1a; Jan y Jan 1997). Se ha identificado que el segmento S4 sirve como sensor de voltaje. Este segmento cargado en unos pocos residuos positivos, detecta los cambios en el potencial de membrana y dirige cambios conformacionales en la proteína del canal, permitiendo su activación y el paso de iones a través de él (Bezanilla y Armstrong, 1972; Bezanilla y Stephani, 1994). Entre los segmentos S5 y S6 se encuentra una región hidrofóbica denominada H5, la cual forma el poro acuoso y es la vía por la cual fluyen los iones (Mackinnon, 1991) Tanto el grupo amino terminal como el carboxilo terminal se encuentran del lado citoplásmico (Rudy, 1988).

2.2 Canales de Potasio Rectificadores Entrantes (Kir).

Los canales rectificadores entrantes (canales Kir) constituyen una gran familia de canales de potasio, que estructuralmente y funcionalmente son distintos de los canales Kv. Todos los integrantes de esta familia presentan el fenómeno denominado rectificación entrante. Este término describe el hecho en que la corriente entrante evocada por una hiperpolarización del potencial de equilibrio del potasio (E_K) es mayor que la producida por una despolarización de la misma magnitud (esquema 2). De esta manera los canales Kir, permiten el flujo de iones K^+ hacia el interior de la célula, pero no permiten el flujo hacia el exterior de ésta (Doupnik et al., 1995). Esta propiedad de rectificación se debe al bloqueo de la corriente saliente de K^+ por el Mg^{2+} (Esquema 2a; Matsuda, 1988) y por las poliaminas citosólicas (Lopatín, et al., 1994).

Estos canales iónicos fueron primeramente llamados rectificadores anómalos (Katz, 1949). Los canales Kir pueden ser regulados por hormonas, neurotransmisores y estados metabólicos internos (Hille, 1992).

El papel funcional de los canales Kir depende críticamente del grado de rectificación. Los fuertes rectificadores generalmente se localizan en células de la glia, neuronas del sistema nervioso central (Newman 1993), musculares cardíacas y musculares esqueléticas (Katz, 1949). Estos canales son esenciales en mantener el potencial de reposo y la duración de la meseta característico de el potencial de acción cardíaco. Una alta conductancia a voltajes negativos permite a la célula mantener estable el potencial de reposo, pero la conductancia muy reducida a potenciales positivos evita un corto circuito en el potencial de acción (Nichols y



Esquema 2: Curva de la corriente en función del voltaje. Corresponde a un registro en ovocitos de *Xenopus* del canal Kir3.5 utilizando 118mM de potasio en la solución externa

Lopatin, 1997). Los canales Kir que muestran ligera rectificación permiten un flujo sustancial de corriente saliente a voltajes positivos (Nichols y Lederer, 1991). Están involucrados en el flujo de potasio a través del epitelio, pero en células excitables actúan como supresores de la excitabilidad (Ashcroft, 1999). Algunos tipos de canales de canales Kir median el efecto de hormonas y neurotransmisores sobre la excitabilidad celular. Tal es el caso de los canales de K^+ rectificadores entrantes regulados por proteínas G del corazón y del cerebro. Otros canales Kir son importantes en la regulación de la secreción de insulina de las células β pancreáticas y el control del tono muscular vascular (Nichols y Lopatin, 1997).

2.2.1 Clasificación

Los primeros canales rectificadores entrantes clonados fueron el ROMK1, IRK1 y GIRK1 (Ho et al., 1993; Kubo et al., 1993a, b). Originalmente, los nombres de esos canales se basaron en la distribución del tejido del cual fueron clonados. Subsecuentemente, se propuso que la nomenclatura de estos canales sería con base basara en la homología de la secuencia de aminoácidos (Doupnik et al., 1995; tabla 1). Hasta la fecha se han clonado 7 subfamilias. En la tabla 1 se muestran las subfamilias de los canales Kir, su localización y algunas características que identifican a cada subfamilia.

Tabla1. Muestra las subfamilias de los canales Kir, su localización y algunas características importantes de estos canales.

SUBFAMILIA	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS
Kir 1 ¹ ROMK	- Riñón de rata - Tálamo. - Hipotálamo - Pituitaria	- Ligeros rectificadores. - Forman homomultímeros funcionales - En el dominio del C-terminal presenta un sitio de unión a ATP - presentan "splicing" alternativo
Kir 2 ² IRK	- Macrófago de rata. - Músculo liso. - Células endoteliales - Osteoclastos.	- Buenos rectificadores - Homomultímeros funcionales - Conductancia unitaria varía de 10 a 35 pS
Kir 3 ^{2a} GIRK	- Corazón - Cerebro - Tejidos endocrinos - Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	- Buenos rectificadores - Heteromultímeros funcionales. - Activados por proteínas G.
Kir 4 ³	- Cerebro de rata	- Forman homomultímeros funcionales
Kir 5 ³	- Cerebro de rata. - Testículo de rata ^{3a}	- No forman canales funcionales en ovocitos - Mayormente expresados durante la espermatogénesis ^{3a} - Forman heteromultímeros con Kir 4.1 ^{3b}
Kir 6 ⁴ KATP	- Corazón. - Músculo esquelético. - Islotes pancreáticos. - Pituitaria	- Asociados a receptores de sulfonilurea (SUR) - Dependientes de ATP - Heteromultímeros funcionales.
Kir 7 ⁵	- Cerebro - Células de purkinje - células piramidales - Riñón - Intestino	- Presenta ligera rectificación y esta no depende directamente del Mg ²⁺ interno Presenta una corriente unitaria muy baja (~50fS) - Proteína de 45 kDa

¹ Ho et al., 1993.

² Kubo et al., 1993

^{2a} Kubo et al., 1993a, b

³ Bond et al., 1991

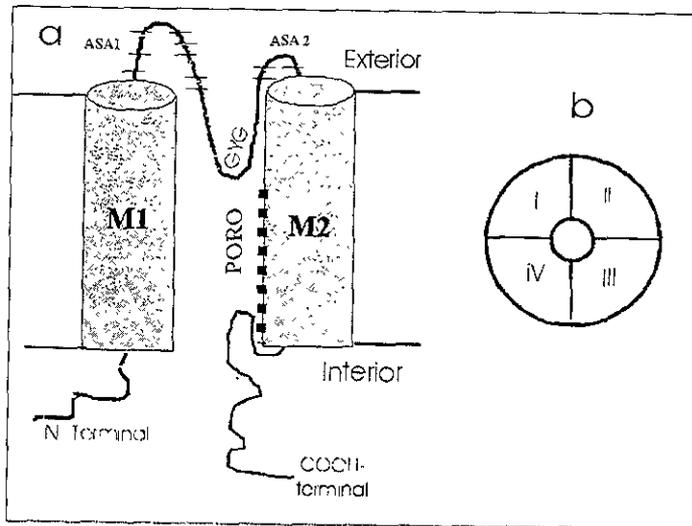
^{3a} Salvatore et al., 1999

^{3b} Pessia et al., 1996

⁴ Inagaki et al., 1995

2.2.2 Estructura de los Canales Kir.

Estos canales se encuentran constituidas de 372 a 500 aminoácidos y tienen una masa molecular aproximada a los 40 kDa. Tanto el amino como el carboxilo se encuentran del lado citoplásmico. A diferencia de los canales Kv, una subunidad α posee únicamente dos segmentos transmembranales M1 y M2 (S5 y S6 en Kv's;



Esquema 3: Representación de un canal Kir. a) Topología membranar de una subunidad α . El filtro de selectividad localizado en la región IIS (GYG). Los dos segmentos transmembranales M1 y M2. Obsérvese que parte del carboxilo y del dominio M2 (línea punteada) forman la región del poro interno. b) Ejemplifica el tetrámero formado por cuatro subunidades α .

esquema 3a: Ho et al., 1993, Kubo et al., 1993 Y 1993b) Como sucede en los canales KV, un canal funcional se encuentra formado por cuatro subunidades α (esquema 3b) Existen evidencias de que la capacidad de ensamblarse radica en el dominio M2 y la parte proximal del carboxilo terminal (Finker, et al., 1996). Estos

canales pueden formar tanto homomultímeros como heteromultímeros (ver tabla 1, Inanobe et al., 1995)

2.2.3 El Poro.

Entre estos dos segmentos transmembranales se encuentra la región del poro (H5) por el cual fluyen los iones (esquema 3a; Taglialatela et al., 1994, Kubo, 1994, Doupnik et al., 1995). La región H5 es la más conservada en todos los integrantes de la familia de canales Kir, dentro de esta región se encuentra el filtro de selectividad cuya secuencia GYG son críticas para la selectividad (esquema 3a, Heginbotham et al., 1992, 1994). Existen evidencias en donde se muestra que la región H5 es la que forma el poro hacia el lado extracelular mientras que la región interna del poro se encuentra formada por la porción citosólica del segmento M2 (esquema 3a; Loussouarn et al., 2000). Se ha reportado para el canal Kir2.1 que el residuo E224 de la cadena citoplasmática del carboxilo, afecta la permeación, por lo cual se ha sugerido que este residuo está involucrado en la formación del poro (esquema 3a; Taglialatela et al., 1994; Yang et al., 1995, Kubo et al., 1998). La estructura cristalina del canal de potasio de bacteria (KcsA, solo dos dominios transmembranales), muestra que la región H5 se encuentra formando la porción externa del poro y contiene el filtro de selectividad, mientras que la porción interna la constituye parte del α -hélice del segmento M2 (Doyle et al., 1998).

2.2.4 La Subfamilia Kir 3

Los canales pertenecientes a esta gran subfamilia Kir 3 (GIRK/KGA), son directamente activados por proteínas G acoplados a receptores inhibitorios como el muscarínico M₂, el purinérgico A₁, el dopaminérgico I₂, GABA_B y receptores de somatostatina entre otros. (Koyama, et al., 1994, Losage, et al., 1994; Doupnik, et al., 1995; Yamada et al., 1998). Hasta la fecha se han clonado 5 diferentes canales. Los canales de esta subfamilia se pueden localizar como homomultímeros (Kir 3.2, Inanobe et al., 1999, Kir3.4, Corey y Clapham 1998) o como heteromultímeros Kir

3.1 y Kir3.4 en el corazón (Krapivinski et al., 1995), Kir 3.1 y 3.2 en el hipocampo y cerebelo de rata (Liao et al., 1996). Se ha sugerido que Kir 3.1 y Kir 3.4 forman heteromultímeros con una estequiometría 1:1 (Siverman et al., 1996; Corey et al., 1998). Kir 3.1, Kir 3.2 y Kir 3.3 se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro.

En el cerebro estos canales juegan un papel principal en los potenciales sinápticos inhibitorios suprimiendo el disparo neuronal (Yamada et al., 1998). En el corazón, la corriente típica más estudiada es la I_{KACH} , se encuentra formada por el heteromultímero Kir3.1/Kir3.4, esta corriente es activada por hormonas y neurotransmisores como la acetilcolina, somatostatina y adenosina (Werner et al., 1996; Yamada et al., 1998). La acetilcolina liberada por el nervio vago se une y activa al receptor muscarínico M2 localizado en las células marcapaso. El receptor M2 a su vez, activa a la proteína G trimérica ($G\alpha\beta\gamma$, tipo G_i/G_o), ésta se disocia y activa al heteromultímero Kir 3.1/Kir 3.4. En diversos estudios han encontrado que la subunidad $G_{\beta\gamma}$ directamente activa a este heteromultímero e hiperpolariza a la célula y consecuentemente disminuye el ritmo cardiaco (Huang et al., 1997, 1998; Krapivinsky et al., 1998).

Se ha encontrado que los canales Kir 3 son activados por concentraciones elevadas de Na^+ interno y además requiere de la hidrólisis de ATP (Sui et al., 1996; Ho y Murrell-Lagnado, 1999). Subsecuentemente se descubrió que el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) semeja el efecto producido por el ATP y que la ausencia de PIP_2 inhibe la activación de los canales Kir mediada por proteínas G y Na^+ (Sui et al., 1998, Chen et al., 1999).

2.2.5 El Canal Kir 3.5 Clonado de los Ovocitos de la Rana *Xenopus laevis*.

Los ovocitos de la rana africana (*Xenopus laevis*), se utilizan ampliamente como un sistema de expresión heterólogo para la caracterización de los canales iónicos y de los receptores membranales a nivel funcional y farmacológico.

Desde etapas tempranas de maduración los ovocitos de estas ranas expresan una gran variedad de corrientes iónicas, de las cuales se han identificado y caracterizado numerosos canales endógenos, los que incluyen canales de Cl^- (Miledi, 1988); canales de Ca^{2+} (Miledi, 1982; Leonard et al., 1987), canales de Na^+ (Parker y Miledi, 1987) y una gran variedad de canales de K^+ (Parker e Ivora, 1990). Cuando se intenta estudiar las propiedades funcionales de los canales iónicos exógenos expresados en los ovocitos a partir de la inyección del mRNA, la presencia de estos canales endógenos puede interferir en la interpretación de los resultados.

Se ha observado que los ovocitos de la rana *Xenopus* presentan una corriente rectificadora entrante endógena (XIR; Bahuer et al., 1996; Hedin et al., 1996) Bauer et al., (1996) y Gamboa (1997) describieron las propiedades funcionales de una corriente de K^+ rectificadora entrante en los canales en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* y observaron que la corriente endógena varía de 0.2 a 0.5 μA y entre sus propiedades farmacológicas se encontró que la corriente endógena es poco sensible al bloqueo por Ba^{2+} , Cs^+ y 4-amino piridina externo.

Hedin et al. (1996) clonó el cDNA de un canal de K^+ rectificador entrante a partir de los ovocitos de la rana *Xenopus*, que permite formar heteromultímeros funcionales con el canal Kir 3.1 (GIRK1) cuando es inyectado el mRNA de este en los ovocitos de la rana. El gene que codifica para este canal posee 1.5 Kb de longitud y codifica para una proteína de 45 kDa con 404 aminoácidos en total. Es estimulado por proteínas G y presenta una homología de 78% con el canal Kir3.4 por lo que se ubica dentro de la subfamilia de los Kir 3 (Hedin et al., 1996).

Hasta la fecha se desconoce el papel principal de esta corriente endógena de los ovocitos de *Xenopus laevis* ni del canal Kir 3.5, pero podría estar influyendo en mantener el potencial de reposo de los ovocitos o en algún proceso de fertilización.

En el laboratorio de la Dra. Laura Escobar se subclonó el canal Kir3.5, tomando como base la región codificante del canal Kir 3.5 propuesta por Hedin et

al. (1996) con el objeto de llevar a cabo estudios de la regulación entre su estructura y su función.

En el presente trabajo trataremos de probar si dos residuos que acotan al poro del canal Kir 3.5 subclonado en el laboratorio, participan en la sensibilidad al Ba^{2+} externo

3. ANTECEDENTES

3.1 Bloqueo de la Corriente por Ba^{2+} Externo.

Los iones Ba^{2+} inhiben una amplia variedad de canales de potasio expresados en diferentes tejidos incluyendo los canales de K^+ rectificadores tardíos del axón de calamar gigante (Gilbert et al., 1969; Armstrong et al., 1982). Los efectos inhibitorios del Ba^{2+} también han sido demostrados en diferentes canales de K^+ rectificadores entrantes, incluyendo aquellos clonados de macrófago de rata (Kubo et al., 1993); de cerebro de ratón y de humano (Makina et al., 1994; Moshige et al., 1994), riñón de rata (Zhou et al., 1996) y de corazón de humano entre otros (Ashen et al., 1995). La aplicación de Ba^{2+} extracelular a los canales rectificadores entrantes clonados o nativos resulta en la inhibición de las corrientes dependiente del voltaje y del tiempo (Shieh et al., 1998), y ésta aumenta conforme el potencial de membrana se hace más negativo (Hagiwara et al., 1979). Sin embargo, la caracterización detallada del bloqueo por Ba^{2+} en la mayoría de los canales de K^+ rectificadores entrantes no ha sido muy estudiada.

Los iones Ba^{2+} y K^+ tienen un radio cristalino similar, es por ello que se ha sugerido que los iones Ba^{2+} inhiben los canales de K^+ a través de la entrada al poro cuando los canales están abiertos debido a cambios en el potencial de membrana (Armstrong et al., 1982). Por otra parte, se ha mencionado que el bloqueo de los canales de K^+ por el Ba^{2+} es debido a la interacción de los iones Ba^{2+} con algunos

aminoácidos que revisten el poro de los canales (Hurts et al., 1996; Zhou et al., 1996; Shieh et al., 1998).

En la mayoría de los casos el Ba^{2+} puede bloquear los canales en ambos lados de la membrana (Tagliataela et al., 1994). Se ha sugerido que el bloqueo por el Ba^{2+} es debido a la unión de este en un sitio localizado en la región del poro (H5), por lo tanto el Ba^{2+} actúa como un inhibidor competitivo (Vergara y Latorre 1983).

Los efectos inhibitorios del Ba^{2+} extracelular han sido demostrados en diferentes canales Kir (Tabla 2). La aplicación del Ba^{2+} extracelular a cualquier canal Kir ya sea clonado o nativo trae como resultado efectos inhibitorios en la corriente de K^+ dependiente del voltaje y del tiempo.

Gamboa et al. (1998) caracterizaron el efecto del ion Ba^{2+} sobre el canal endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus* y encontraron que el bloqueo por Ba^{2+} externo presenta una baja afinidad. En el pico de la corriente el bloqueo fue independiente del voltaje mostrando una K_d de 0.9 mM, mientras que a los 80 ms de iniciado el pulso el bloqueo de la corriente es dependiente de voltaje ($K_d=31$ mM a -160 mV; $K_d 1.9$ mM a -60 mV). Por lo anterior, proponen que en este canal endógeno existen dos sitios posibles para el bloqueo por Ba^{2+} externo uno externo que podría estar acotando la región del poro y uno interno que posiblemente se encuentre dentro de la región del poro.

Shieh et al., 1998 estudiaron las interacciones del Ba^{2+} con el ion permeante (K^+) en el canal Kir2.1 y se encontró que el bloqueo extracelular debido al Ba^{2+} fue inhibido por K^+ intracelular, debido a que estos iones compiten por el mismo sitio de unión. También identificaron las interacciones del Ba^{2+} con los factores de rectificación como lo son el Mg^{+2} y las poliaminas. Además encontraron que el Ba^{2+} intracelular acelera la rectificación de la corriente saliente ya que interfiere con los mecanismos intrínsecos del "gating" del canal.

Los estudios en biología molecular para tratar de identificar los posibles sitios que están involucrados en el bloqueo por Ba^{2+} son pocos y se enfocan

principalmente al bloqueo interno y a los canales dependientes de voltaje. Al respecto tenemos que Taglialaela et al., (1994) encontraron para los canales rectificadores tardíos, que una mutación puntual de valina (V) por treonina (T) en el residuo 374 (V374T) de la región del poro, puede modificar la sensibilidad al Ba^{2+} interno. Por su parte Hurts et al., (1996) encontraron en canales de K^+ tipo "Shaker", que el residuo en la posición 449 (T) también en la región del poro, puede influir en la sensibilidad al bloqueo por Ba^{2+} y muestran que el bloqueo por este ión tiene dos componentes uno rápido y uno lento.

Navaratnam et al., (1995) reportan la clonación de un canal de K^+ rectificador entrante en el oído interno de pollo homólogo al Kir2.1 clonado de rata. Este canal de pollo es menos sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo. Se comparó la secuencia de aminoácidos de éste con el clonado de la rata y se observó que presentan pocas diferencias, una de las cuales se localiza en el asa 1 que conecta el dominio M1 con el poro; el canal clonado de rata presenta un residuo de glutamato (E) en la posición 125, mientras que el clonado de pollo (cKir2.1) presenta un residuo de glutamina (Q). Mutaron el canal clonado de pollo en esa posición y cambiaron el residuo Q125 por E y observaron que a una concentración de Ba^{2+} externo de $30\mu M$ el canal nativo de pollo presenta una inhibición del 70% a -150 mV, mientras que el canal mutante Q125E se bloquea totalmente (-160 a -130 mV) y además aumenta la conductancia del canal. Por lo anterior, concluyen que este residuo puede jugar un papel muy importante en la conductancia y bloqueo por Ba^{2+} externo, y la interacción del Ba^{2+} con el canal puede ser del tipo electrostático por la carga del aminoácido.

Krapivinsky et al., (1998) clonaron un canal de K^+ rectificador entrante, el canal Kir7.1, el cual presenta propiedades únicas como una baja conductancia unitaria y una baja sensibilidad al Ba^{2+} externo ($EC_{50} = 1mM$). Compararon la secuencia de aminoácidos de este canal en la región del poro con los demás integrantes de esta subfamilia y encontraron 3 diferencias: la S111, M125 y G129, mutaron esos residuos uno a uno por el aminoácido correspondiente en los otros

canales y observaron los cambios en la conductancia y sensibilidad al Ba^{2+} externo. La mutante S111L no mostró diferencias con el canal silvestre. Al mutar G129E no se expresaron canales funcionales. Cuando se mutó M125R la conductancia unitaria se incrementó, no cambió la selectividad iónica y la sensibilidad al Ba^{2+} externo aumentó 10 veces ($EC_{50} = K_d = 100\mu M$). Esos autores sugieren que esta posición es importante en la conductancia del canal y la sensibilidad al Ba^{2+} externo.

Zhou et al., (1996) al observar que el canal Kir 1.2 es menos sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo que el Kir 2.1 (Tabla 2), compararon las secuencias de aminoácidos en la región H5 de los canales y observaron que en la posición 117 y 121 del canal Kir 1.1, el canal Kir 2.1 en la región homóloga presentan residuos de aminoácidos diferentes (137 y 141 en Kir 2.1), en la primera posición Kir 1.2 tiene una leucina y en la segunda una valina (V), mientras que Kir 2.1 posee una isoleucina (I; tabla 3) y una treonina (T; tabla 3) respectivamente. Hicieron mutaciones en dichas regiones y compararon el cambio en la sensibilidad al bloqueo por Ba^{2+} externo (canal silvestre $K_d = 70\mu M$, mutante L117F $K_d = 80\mu M$, L117F/V121T $K_d = 10\mu M$ y V121T $EC_{50} = 6\mu M$ a -90 mV). Al mutar el residuo V121 por una T la sensibilidad al Ba^{2+} se incrementó por un factor de 10, por lo tanto, concluyeron que este residuo está implicado en la sensibilidad al Ba^{2+} externo y sugieren que este sitio puede ser el de unión al Ba^{2+} para este canal.

En la tabla 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de los canales Kir1.2, Kir2.1 y Kir3.5. Zou et al., (1996) proponen que el residuo T141 en el canal Kir 2.1 (V121 en Kir 1.2 y T145, en el canal Kir 3.5), aumenta la sensibilidad al bloqueo por Ba^{2+} externo (tabla 3), esto no es del todo cierto porque al observar las secuencias en la tabla 3 el canal Kir3.5 tiene una T en la misma posición que el Kir2.1 y su sensibilidad al Ba^{2+} externo es más baja, por lo que se puede sugerir que hay más de un residuo involucrado en el sitio de unión al Ba^{2+} externo y que además las asas 1 y 2 pueden también estar implicadas en este bloqueo.

Al comparar las secuencias de aminoácidos en la tabla 3, podemos observar que existen residuos que posiblemente pueden estar implicados en el bloqueo. Estos residuos tentativos corresponden a la posición 129 y 157 en el canal Kir3.5 (tabla 3 * y ♦ respectivamente). El residuo 129 corresponde a un residuo polar no cargado (asparagina "N") en el canal Kir3.5 y esta localizado en el asa 1 (esquema 3; tabla 3 *). En esta posición, el canal Kir2.1 presenta un residuo cargado negativamente un glutamato (E), mientras que el canal Kir1.2 también posee una N en esta posición (N125; tabla 3 *). El residuo 157 corresponde a un residuo cargado positivamente (Lisina K) en el canal Kir3.5 el cual podría estar influyendo en su baja sensibilidad al bloqueo por Ba²⁺ externo y esta localizado en el asa 2 (esquema 3; tabla 3 ♦). En esta posición, el canal Kir2.1 posee un glutamato (E153, tabla 3 ♦), el cual podría estar influyendo en su alta sensibilidad al Ba²⁺ externo. El canal Kir1.2 y el Kir1.1 poseen una glutamina (Q) en esta posición (tabla 3 ♦), la cual podría ser una barrera electrostática entre el Ba²⁺ y el canal.

Tabla 2: Sensibilidad de los canales IRK al Ba²⁺ externo.

Subfamilia	Canal	E _{50%} [Ba ²⁺]	Voltaje (mV)	cita
Kir1 o ROMK	KIR1.2 o ROMK2	70 μM	-100 y -150	Zhou et al, 1991
KIR2 o IRK	KIR2.1 o IRK1	30 μM	-100 y -150	Kubo et al, 1993
	KIR2.2 o MB-IRK2	50 μM	-100	Iakobson et al, 1994
KIR3	KIR3.3/3.4 GIRK1/GIRK4	500 μM	-80	Kupwinsky et al, 1995
	KIR3.5 o XIR (corriente endógena de los ovocitos)	350 μM	-160	Bauz et al, 1996
	KIR3.5a	117 μM	De -70 a -160	Sobczak et al, 2000
KIR4	KIR4.1	30 μM	-100	Breder et al, 1991
KIR6	KIR6.2	3 mM	-100	Suk et al, 1995
KIR7	KIR7.1	1000 μM	-100	Kupwinsky et al, 1998

TABLA 3. Secuencias de aminoácidos en la región del poro

	Asa1	PORO _{externo}	Asa2
Kir 1.2	¹⁰¹ P C V E N I N G M T S	A F L F S <u>L</u> E T Q <u>V</u> T I G Y G F R F V T	E Q C A T ¹³⁶
Kir 2.1	¹²¹ A C V S <u>E</u> V N S F T A	A F L F S <u>I</u> E T Q <u>T</u> T I G Y G F R C V T	D <u>E</u> C P I ¹⁵⁰
Kir 3.5	¹²⁵ P C V E <u>N</u> L N G F V S	A F L F S <u>I</u> E T E <u>T</u> T I G Y G Y R V I T	E <u>K</u> C P E ¹⁶⁰

3.2 Justificación

Posiblemente el bloqueador de canales de K^+ más comúnmente usado sea el Ba^{2+} , no obstante los estudios realizados para comprobar cuales son los sitios donde interactúa con los canales no son suficientes y el Ba^{2+} actúa de diferente forma con cada uno de los canales estudiados, por ejemplo el canal Kir2.1 es altamente sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo Zhou et al., (1996) comprueban que para el canal Kir 2.1 al cambiar de V121 a T la sensibilidad al Ba^{2+} externo se aumento por lo tanto la T es el residuo responsable de acrecentar esta sensibilidad. El canal Kir3.5 en la posición equivalente a la T141 del canal Kir 2.1 tiene el mismo residuo (T145 en Kir 3.5) y es menos sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo que el canal Kir 1.2 y Kir 2.1 (tabla 2 y 3), es por ello que resulta importante conocer los sitios en el canal Kir3.5 que podrían estar involucrados en la baja sensibilidad al bloqueo por bario externo, además de que se trata de un canal que es 78% homologo al canal Kir3.4, siendo este último muy importante en la regulación del ritmo cardiaco. En este estudio nos enfocaremos principalmente a dos sitios tentativos N129 y K157, localizados entre las regiones que acotan al poro (asa 1 y asa 2). Debido a su localización y por presentar presentan residuos cargados negativamente (sitios homólogos) en otros canales mas sensibles al Ba^{2+} externo resulta muy interesante explorarlos como posibles sitios involucrados en la sensibilidad al Ba^{2+} externo (tabla 3)

4 OBJETIVO GENERAL

Identificar los sitios de bloqueo por bario externo en el canal de potasio rectificador entrante, (Kir3.5).

4.1 Objetivo Particular

- Determinar si los residuos N129 y K157 del canal Kir3.5 participan en los sitios de unión al Ba²⁺ externo.
 - Cambiar uno a uno los residuos N129 y K157 por un residuo cargado negativamente (E)
 - Expresar los canales mutados en ovocitos de *Xenopus laevis*.
 - Comprobar si la sensibilidad al Ba²⁺ externo cambió con la mutación

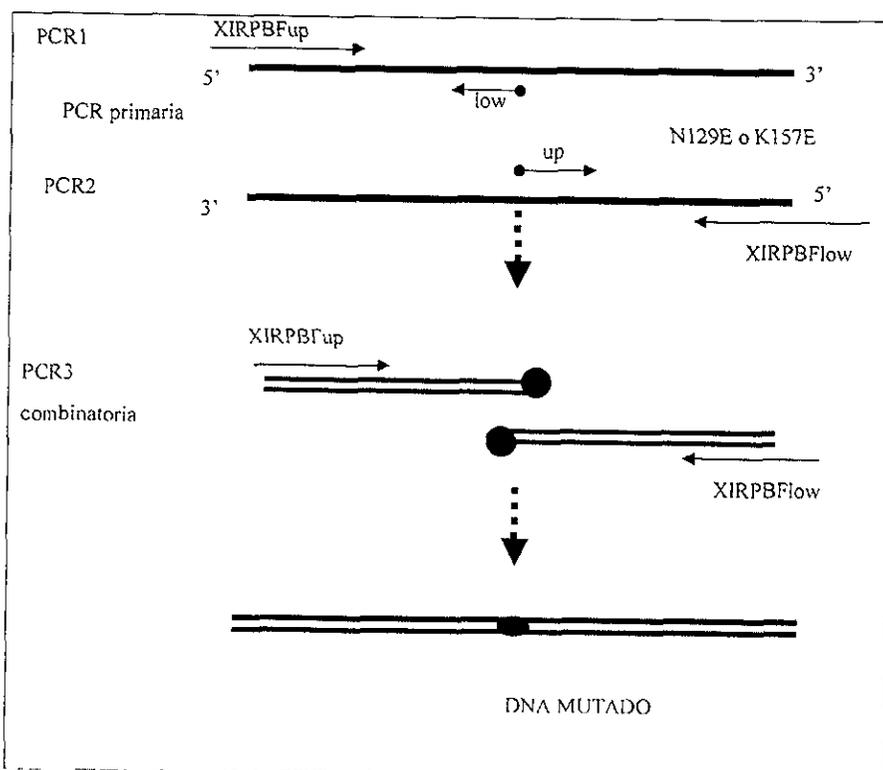
4.2 Hipótesis

Al mutar los residuos uno a uno de N129E y K157E, el canal Kir3.5 será más sensible al bloqueo por Ba²⁺ externo

5. MÉTODOS. BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR

Se diseñaron 2 iniciadores (oligos o cebadores) que acotan la región codificante del canal Kir 3.5 los cuales tienen introducido un sitio para una enzima de restricción (5'[XIRPBFup] y 3'[XIRPBFlow]; Anexo), y dos iniciadores mutados de 19 bases para cada residuo a mutar N129E y K157E (5' y 3' [up y low] para c/u; anexo I). Estos oligos se utilizaron para introducir la mutación correspondiente con la técnica de mutagénesis dirigida por PCR (Polimerase Chain Reaction; Erlich, 1992; Weiner et al 1995; Zhu, 1992, 1997).



Esquema 4. Diagrama en que se representa la estrategia a seguir para obtener el fragmento mutado de 1200pb N129E y K157E. En la PCR primaria PCR1 y 2 se generan los fragmentos mutados que sirven de molde para la PCR combinatoria PCR3 (Ver texto)

En el esquema 4 se muestra la estrategia a seguir para obtener los canales mutados. Primeramente se realizan dos amplificaciones del DNA con diferentes iniciadores con el objeto de obtener dos fragmentos que contienen 19pb idénticas incluyendo la mutación deseada. En la primera amplificación se utilizan el iniciador silvestre 5'(XIRPBFup) y el iniciador 3' mutado (N131Elow o K157Elow; Esquema 4, PCR1). En esta amplificación se generan fragmentos de 400pb y 450pb. Para la segunda amplificación se utilizan el iniciador mutante 5' (N131Eup o K157Eup) y el iniciador silvestre 3' (XIRPBFow; Esquema 4, PCR2). En esta amplificación se generan fragmentos de 800pb y 750pb para la mutante N129E y K157E respectivamente. Los fragmentos obtenidos se purifican a partir de geles de agarosa al 1%.

En una tercera amplificación se emplea como molde de DNA los fragmentos obtenidos en la PCR1 y PCR2 para cada mutante. En esta amplificación los iniciadores a los extremos utilizados son el 5' "XIRPBFup" y el 3' XIRPBFow" (Esquema 4: PCR3, combinatoria). Los fragmentos se hibridan en sus 19 bases que comparten y se amplifican con los iniciadores a los extremos. En esta amplificación que conlleva una recombinación se obtiene un fragmento de 1200 pb que corresponden a la secuencia codificante del canal Kir 3.5.

NOTA Para encontrar las condiciones óptimas de amplificación se realizaron pruebas de PCR utilizando la enzima Taq DNA polimerasa (Gibco, BRL). Las reacciones posteriores se efectuaron con un conjunto de DNA polimerasas presentes en el Kit Expand™ (Boeringer Mannheim).

5.2 Clonación

5.2.1 Ligación

Para la ligación del canal mutado (N129E o K193E) al vector PBF primeramente se digieren el fragmento mutado (N129E y K157E) y el vector PBF con las enzimas de restricción Sal I y Pst I (Gibco, BRL) para generar los extremos

cohesivos (esquema 5a) El vector, además, fue tratado con la enzima fosfatasa alcalina (Boeringer Mannheim). Posteriormente tanto el vector y el fragmento digerido se colocan en una reacción de ligación cuyas condiciones se presentan en la tabla 4 (esquema 5b y 5c).

Tabla 4. Condiciones de la reacción de ligación

	Control1	control 2	N129E o K157E		
			1:1	3:1	1:5
Buffer	∅	✓	✓	✓	✓
ATP	∅	✓	✓	✓	✓
Fragmento	∅	∅	✓	✓	✓
Vector	✓	✓	✓	✓	✓
T4 ligasa (Boeringer, Mannheim)	∅	✓	✓	✓	✓

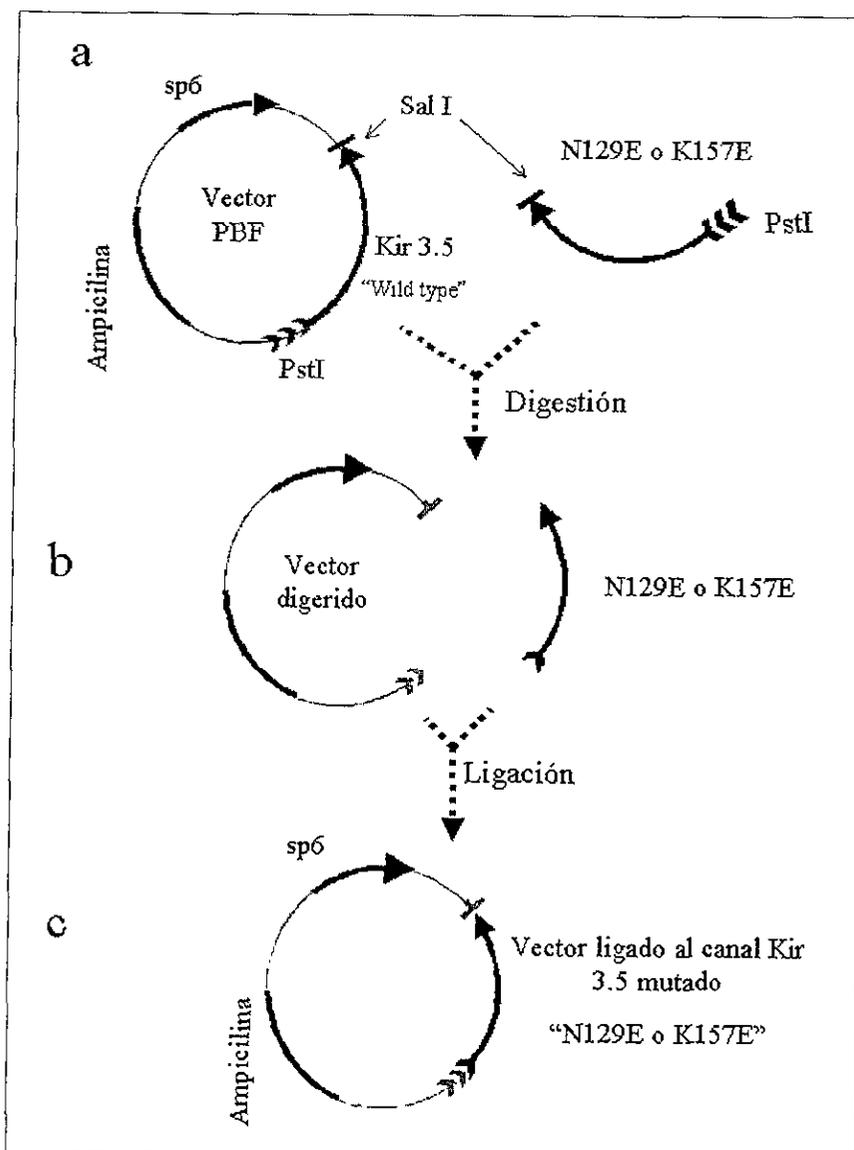
∅. no se adicionó

✓. adicionado

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche.

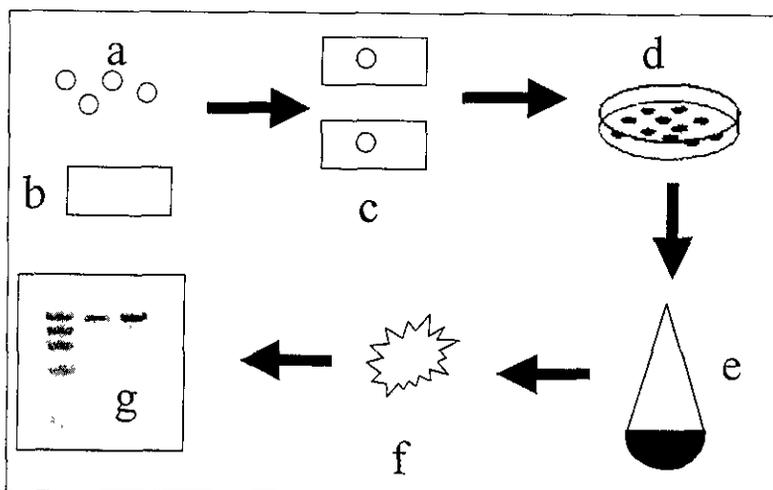
5.2.2 Transformación

Se prepararon células competentes de una cepa de *E. coli* (DH5 α ; Ver anexo II) y se transformaron con el DNA inserto en el vector PBF (esquema 6c), es decir con las reacciones de ligación de mostradas en la tabla 4. La transformación se realizó con el método de choque térmico (Sambrook et al, 1989; esquema 6c). Como controles extras, se utilizó un blanco sin transformación como control negativo y como control positivo el canal BIR11



Esquema 5. Diagrama que ejemplifica la estrategia de ligación a) El vector PBF y fragmento amplificado por PCR (N129E o K157E) se digieren con las enzimas de restricción Sal I y PST I. b) Los productos de la digestión se purifican y se colocan en una reacción de ligación (ver tabla 3) c) Canal mutado (N129E o K157E) ligado al vector PBF.

Después de la transformación, las bacterias con el plásmido se sembraron en medio Luria-Bertani (LB) sólido con antibiótico (Ampicilina: Anexo III) y se incubaron a 37 °C por 24 horas (esquema 6d; Anexo III). Se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Al azar se tomaron varias UFC y se incubaron en medio LB líquido con antibiótico (Mini Prep) a 37 °C, por 24 horas (esquema 5e). El DNA (plásmido) de esta mini preparación se aisló por el método de lisis alcalina (Sambrook, et al,1989).



Esquema 6: Método general de transformación a) fragmento de DNA mutado. b) Bacterias competentes c) Bacterias Transformadas. d) Crecimiento de colonias. e) Maxiprep f) Purificación de DNA g) Monitoreo en gels de agarosa

Se realizaron análisis con enzimas de restricción (esquema 6g).

Se procedió a obtener el plásmido (PBFN129E y PBF157E) a gran escala utilizando el kit Plasmid Maxi Prep (Quiagen; Esquema 6c y 6f) El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría con luz UV a 260 nm.

5.2.3 Secuenciación.

Para verificar que los canales mutados (PBFN129E y PBFK157E) presentan la mutación se secuenció el DNA por el método radiactivo utilizando dideoxinucleótidos marcados con P^{33} con el Kit Termo Sequenase Cycle Sequencing (Amersham, Life Science). Posteriormente se secuenció totalmente el canal por el método de secuenciación automatizada con el Kit TM Dye Terminator utilizando el secuenciador ABI Prism 310 (Perkin Elmer).

NOTA: Todas las pruebas que involucraron en manejo de DNA se exploraron en geles de agarosa al 1% (anexo III). La purificación de fragmentos como los obtenidos de PCR, se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el Kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel).

∴

5.3 Transcripción *in vitro*

La transcripción del DNA a RNAm para la inyección en ovocitos se realizó con la enzima SP6 RNA polimerasa (Boeringer, Mannaheim; Sambrook y col 1989; Figura 7a).

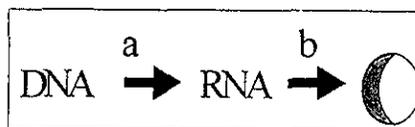


Figura 7: a) Transcripción b) Inyección del RNAm a ovocitos de rana *Xenopus*.

6 METODOS ELECTROFISIOLOGÍA

6.1 Obtención e Inyección de los Ovocitos.

Ovocitos de *Xenopus laevis* de los estadios V-VI se aislaron por ovariectomía parcial y se desfolicularon con un tratamiento con colagenasa tipo 1A (2mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) y se lavaron con medio ND96; cinco veces con ND96 sin Ca^{2+} , otras cinco con ND96 con calcio y las últimas cinco con Ca^{2+} y gentamicina (Anexo III).

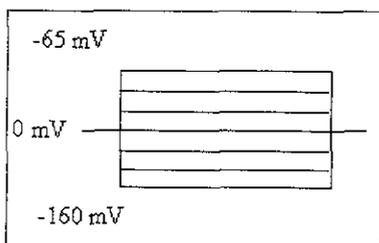
Al día siguiente de la obtención de los ovocitos, se inyectó el RNAm del canal silvestre y de los canales mutados en concentraciones de: 10, 30 y 50ng por ovocito. Esto se realizó con el objeto de poder registrar la corriente por mas días Los ovocitos se mantuvieron en medio ND96 con gentamicina.

6.2 Obtención de los Registros.

Los registros se llevaron a cabo con la técnica de fijación de voltaje con dos micro electrodos (Voltage Clamp) utilizando un amplificador GENECLAMP 500 (AXON INSTRUMENTS). La solución de registro utilizada lleva una concentración de 118 mM de K^+ (Anexo). El monitoreo de la expresión se realizó después de 24 horas de la inyección y hasta que se encontraran niveles mayores de 6 μA para minimizar el efecto de la corriente endógena presente en los ovocitos.

Se utilizaron concentraciones crecientes de Ba^{2+} en la solución para probar si la sensibilidad a este ión se modifico con la mutación Las concentraciones utilizadas del ión Ba^{2+} dadas en mM fueron: 0;0.0005;0.001; 0.01; 0.02; 0.05; 0.075; 0.1, 0.15, 0.2; 0.25; 0.3; 0.5; 1; 3; 5, 10 y 20

El protocolo de pulsos utilizados fueron a partir de -160mV en saltos de $+15\text{mV}$ teniendo en total 16 pulsos. El potencial de mantenimiento se fijó a 0mV y la duración de los pulsos fue de 100ms (esquema 8).



Esquema 8: Croquis que representa el protocolo de pulsos utilizado. La duración total de los pulsos es de 100ms

6.3 Análisis de los Registros

Con las corrientes obtenidas a 8ms y 99ms del pulso, se construyeron las curvas corriente contra voltaje (I/V).

Para observar si la K_d al Ba^{2+} se modificó en las mutantes se tomaron 7 pulsos que van desde -160mV a -70mV . Los datos para cada pulso se normalizaron restando la corriente observada a una concentración de 20mM y dividiendo los datos entre la corriente observada a 0mM de Ba^{2+} externo.

Se graficaron los datos y fueron ajustados con la ecuación logística para obtener la K_d para cada una de las mutantes así como para la el canal silvestre Kir 3.5. Las graficas y el ajuste se realizó con el paquete Micrococcal Origin 5.0.

El análisis estadístico utilizado fue el de varianza con diferente número de muestras.

7. RESULTADOS BIOLOGÍA MOLECULAR.

7.1 Obtención de los Fragmentos Mutados N129E y K157E.

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación se varió uno a uno los parámetros de PCR como la concentración de Mg^{2+} , la temperatura de alineamiento (TM) y el número de ciclos.

En el gel 1 se muestra el efecto en la variación de la concentración de Mg^{2+} para la mutante N129E. Las bandas de 400pb corresponden a la PCR1 (esquema 4), mientras que los de 800pb a la PCR2 (esquema 4) En el gel 2 se observa el efecto de la variación de la concentración de Mg^{2+} en la PCR combinatoria para esta

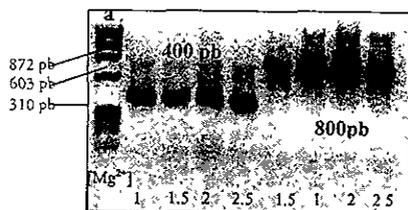


Figura 1: Gel de DNA; PCR primaria N129E variando la concentración de Mg^{2+} [mM]. PCR1 400pb. PCR2 800pb a) marcador de bajo peso molecular (ϕ , anexo I)

mutante (esquema 4: PCR3; figura2: 1200pb). No se observó una diferencia

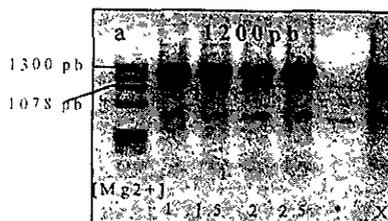


Figura 2 Gel de DNA PCR combinatoria (PCR3) N129E variando la concentración de Mg^{2+} [mM].

a) marcador ϕ , *) Sin iniciadores, X) Ku3 5 silvestre (sin mutar)

Se utilizaron los iniciadores XIRPBE^{up} y XIRPBE^{low}

marcada entre las concentraciones de Mg^{+2} . En la concentración de 1.5 mM de Mg^{2+} se presenta una banda bien definida que corresponden a los tamaños esperado para esta mutante N129E, mientras que las otras concentraciones se observan bandas inespecíficas muy tenues (figura 1 y 2). En la figura 2 se observan además dos bandas de menor peso que corresponden a la amplificación de los fragmentos iniciales que no se hibridaron. Estos mismos resultados se observaron

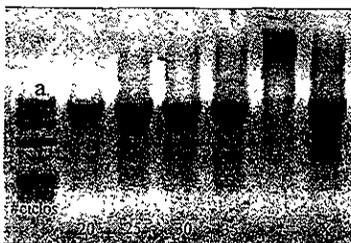


Figura 3: Gel de DNA donde se varía El número de ciclos de la PCR3.

*reacción sin iniciadores (10ng).

X) Amplificación (PCR3) utilizando fragmentos provenientes directamente de la PCR1 y PCR2 sin purificar de gel (30 ciclos; Esquema 4) a) marcador de peso (ϕ)

para la mutante K157E (datos no mostrados).

Al variar la temperatura de alineamiento (TM) se encontró que la temperatura óptima para la reacción fue de 55 °C (datos no mostrados). Variando el número de ciclos en la PCR se encontró que a partir del ciclo 25 ya no se observa aumento en el grosor de la banda (figura 3). En la reacción de PCR cuando únicamente se adicionaron los fragmentos de 400 y 800pb como DNA molde (esquema 4: PCR3) a una concentración de 10ng para cada uno sin la adición de iniciadores a los extremos, no se observó amplificación alguna (figura 3*). Cuando se agregaron directamente los fragmentos de 400 y 800 pb de una reacción de PCR anterior y se adicionaron los reactivos correspondientes para la amplificación normal, se encontró que no es necesario purificar los fragmentos para obtener una amplificación esperada (figura 3**).

Una vez encontradas las condiciones óptimas de amplificación, se procedió a obtener los fragmentos de cada una de las mutantes (ver anexo I).

NOTA Las especificaciones de los marcadores de peso molecular (ϕ y λ) se muestran en el anexo I.

En la figura 4a se muestra la amplificación de los fragmentos de 400 y 800 pb para la mutante N129E (esquema 4: PCR1[400pb] PCR2[800pb]). Se utilizaron las condiciones establecidas para la realización de la PCR. En la figura 4b se muestra la amplificación de los fragmentos para la mutante K157E (PCR1:475pb;PCR2:725pb). Cada reacción de PCR se realizó por triplicado. Los fragmentos obtenidos para cada una de las mutantes se purificaron a partir de geles de agarosa (figura 4c).

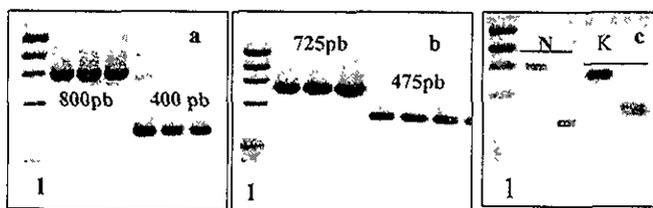


Figura 4 Geles de DNA donde se muestran los fragmentos obtenidos de la PCR primaria (PCR1 y PCR2) a) Mutante N129E, b) Mutante K157E, c) purificación de los fragmentos de los geles a y b. N fragmentos de la mutante N129E; K fragmentos de la mutante K157E. Los primeros carriles de cada gel corresponden al marcador ϕ

Se realizó la PCR combinatoria (esquema 4: PCR3) utilizando como molde los fragmentos purificados de la PCR1 y PCR2 para cada mutante (figura 4c). Para amplificar, se agregaron los iniciadores XIRPBF up y low. En la figura 5a se observan los fragmentos de 1200 pb para cada una de las mutantes. Cada reacción de PCR se realizó por triplicado. Para la mutante N129E, en una de las tres reacciones no se observó amplificación. Tampoco se observó amplificación en las reacciones de PCR en donde no se adicionaron iniciadores a los extremos. Los fragmentos obtenidos de esta PCR3 para cada una de las mutantes se purificaron a partir de geles de agarosa (figura 5b).

En los carriles marcados con asteriscos de la figura 5a se colocaron 10ng de

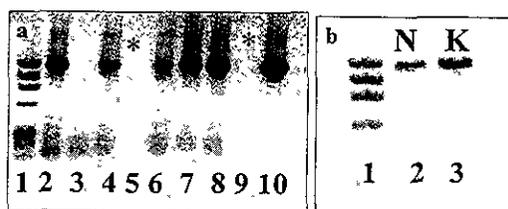


Figura 5: Geles de DNA de la PCR combinatoria (PCR3). a) fragmentos de 1200 pb para cada mutante. Del 2 al 5 N129E; del 7 al 8 K157E. 10 GIRK5 b) Fragmentos purificados del gel 5a, * no se adiciono oligos. En ambos geles el carril 1 es el marcador ϕ

cada DNA molde sin iniciadores a los extremos con el objeto de observar si se amplificaba el canal de 1200pb. Posteriormente se realizaron otras pruebas de PCR sin la adición de iniciadores a los extremos, esta vez se aumentó la concentración del DNA molde. La concentración aproximada de cada fragmento fue de 400 ng. En la figura 6 se muestra la banda de 1200pb obtenida por la recombinación de los fragmentos de las PCR1 y PCR2. En esta figura se observa además los fragmentos que no se lograron recombinar. Para este gel se cargaron 20 μ l de la reacción, esta reacción se realizó por duplicado para cada una de las mutantes (figura 6)

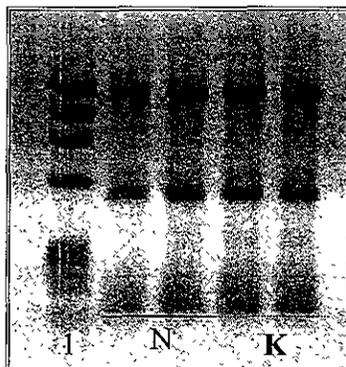


Figura 6. Gel de DNA donde se muestra la recombinación por PCR de las mutantes N129E y K157E sin la adición de iniciadores N) corresponde a la mutante N129E. K) Corresponde a la mutante K157E. No se utilizaron iniciadores a los extremos. 1) Corresponde al marcador de peso molecular (ϕ).

NOTA: La cantidad de DNA aproximada por cada reacción de amplificación colocando 10ng de DNA molde y adicionando los iniciadores correspondientes a los extremos fue de 20 $\mu\text{g}/\text{ul}$ (medida con espectro a 260nm).

7.2 Clonación de los Canales Mutados N129E y K157E.

Una vez obtenidos y purificados los fragmentos mutados N129E y K157E de 1200pb (figura 5b), se procedió a la ligación de estos al vector PBF mediante la generación y ligación de los extremos cohesivos *Sal*I y *Pst*I (tabla 4; esquema 5, figura 7). Los fragmentos digeridos se purificaron e incubaron en la reacción de ligación (esquema 5).

Células competentes DH5 α fueron transformadas con las reacciones de ligación (PBFN129E o PBFK157E; esquema 6a). La viabilidad de las células se comprobó al utilizar un control sin la adición de DNA (control negativo). La capacidad de transformación de las células se verificó utilizando como control 100 ng de DNA del canal BIR11 (esquema 6c). Las células se sembraron en medio LB

sólido con ampicilina para identificar las UFC que incorporaron el vector con el fragmento. El control negativo se sembró también en medio LB sólido sin ampicilina (esquema 6d). Después de las 24 h de incubación se procedió a contar el número de UFC presentes en cada caja (tabla 4; esquema 6d).

Tabla 5. Número de UFC contadas al transformar colonias bacterianas DH5 α con el producto de la ligación.

dilución (V/F)	controles			PBFN129E			PBFK157E			Bir11	
	control sin DNA	C1	C2	1:1	1:3	1:5	1:1	1:3	1:5	100ng	
Ampicilina 1 μ g/ml	Φ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
UFC	incontables	0	1	3	8	18	15	5	15	30	incontables

V/F: vector:fragmento. Base 100ng

Φ : medio LB sin ampicilina

✓: Medio LB con ampicilina

7.2.1 Purificación de los Canales Mutados.

El DNA mutante (PBFN129E y PBFK157E) se obtuvo por lisis alcalina (miniprep; anexo II). Se seleccionaron al azar 3 UFC para cada una de las mutantes y como control positivo se tomó 1 UFC del canal Bir 11. Se tomó 1 μ l del DNA purificado para observarse en gel de agarosa (DNA sin digerir). En la figura 7 se muestra el DNA purificado del canal Bir 11 (figura 7 carril 2) y los canales mutados PBFN129E (figura 7 carril 3, 6 y 8) y PBFK157E (figura 7 carril 4, 7 y 8). En la figura 7 carril 5 se muestra el DNA del canal silvestre Kir 3.5 inserto en el vector PBF, podemos observar que las mutantes PBFN129E y PBFK157E corresponden al mismo peso molecular. En todas las muestras cargadas se observan 3 bandas (figura 7).

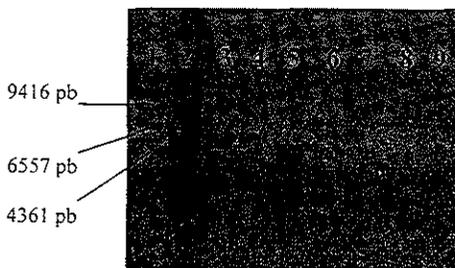


Figura 7: Gel de DNA donde se muestran los plásmidos purificado. 1- marcador de alto (λ ; ver anexo I) y bajo peso (\emptyset ; ver anexo I), 2 canal BIR11; 5 canal kir3.5 silvestre; 3, 6 y 8 PBFN129E, 4, 7 y 9 K157E

Se efectuaron análisis de restricción enzimática de las mutantes PBFN129E, PBFK157E y el canal Kir 3.5 silvestre. En la tabla 6 se muestran un ejemplo de una reacción de digestión y los pesos esperados para cada reacción enzimática. En la figura 8 se ejemplifica la digestión enzimática de una muestra para cada canal. Los carriles 2, 5 y 8 corresponden a el canal silvestre, los carriles 3, 6 y 9 a una muestra de la mutante PBFN129E y los carriles 4, 7 y 10 a una muestras de la mutante PBFK157E (figura 8 a y b). Los carriles 2,3 y 4 de la figura 8a corresponden a las muestras sin digerir. Se realizaron las digestiones por triplicado. Los canales mutantes presentan el mismo patrón de digestión que el canal silvestre y los tamaños esperados son iguales a los observados (figura 8 a y b: tabla 6)

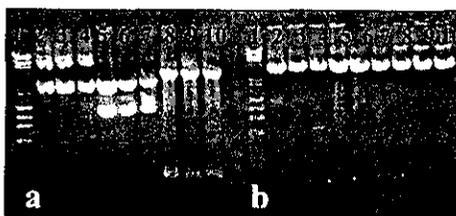


Figura 8: Gel de DNA donde se ejemplifica la digestión enzimática de restricción. Los carriles 2, 5 y 8 corresponden al canal silvestre, 3, 6 y 9 a la mutante PBFN129E y 4, 7 y 10 a la mutante PBFK157E. 1 corresponde al marcador de peso molecular (λ y \emptyset , mezclados)

Tabla 6: Condiciones de digestión enzimática.

Reactivos	concentración	PBFN129E, PBFK157E y Kir3.5				
DNA		~ 1µg				
Enzima1	10u	SalI	Xho I			
Enzima 2	10u	PstI	Hind III	Xba I	Bam HI	Kpn I
Tamaño esperado en pb		1200	171	lineariza	123	lineariza
		3000	4029		4077	
		figura 8a		figura 8b		
carriles		5-7	8-10	2-4	5-7	8-10

7.2.2 Secuenciación de los Canales.

Una vez que se comprobó que no se modificó el patrón de digestión enzimática se procedió a corroborar si efectivamente los canales tienen introducida la mutación. Se secuenciaron 5 muestras de cada canal mutante en la región de la mutación utilizando dideoxinucleótidos marcados radiactivamente con ^{33}P , para comprobar que nuestra mutación estaba presente. Con esta técnica se consiguieron secuenciar 150 bases por reacción. Todas las muestras secuenciadas de la mutante PBFN129E presentan la mutación, mientras que para la mutante K157E solo 3 de las 4 secuenciadas presentan la mutación.

Posteriormente se secuenciaron completamente las 1220 pb que conforman la secuencia de cada uno de los canales mutados. Con la técnica de secuenciación automatizada se obtuvo la secuencia de aproximadamente de 650 bases por reacción. En la figura 9 se exhibe una de las regiones secuenciadas de una mutante PBFN129E. La secuencia corresponde a la cadena líder del cDNA N129E; en negritas se observa el codón que codifica para el residuo E, y también se muestra el codón silvestre que corresponde al residuo de N.

En la figura 10 se muestra una de las regiones secuenciadas para la mutante PBFK157E. La secuencia corresponde a la cadena complementaria del canal mutante K157E. Al igual que la figura 9 se resalto en negritas el cambio de bases en el codon mutado y se muestra su codon silvestre.

No se presentó ningún otro cambio de base alguna en el DNA secuenciado para ambas mutantes respecto al canal silvestre que pudiera afectar el marco de lectura o la secuencia de aminoácidos. La secuencia de DNA de los canales mutados (PBFN129E y PBFK157E), únicamente difieren del silvestre en la mutación introducida. En la figura 9 y 10 se resaltó el codon mutante y se muestra el codon que presenta el canal silvestre.

7.3 Transcripción *in vitro*

Primeramente se tomo una muestra para cada una de las mutantes y una muestra del canal sin mutar, se digirió el DNA con la enzima Mlu I para linearizar el vector con el canal mutado y el wt. Posteriormente se prosiguió a realizar la transcripción *in vitro* (Sambrook y col. 1989). Esta reacción fue catalizada con la enzima Sp6 RNA polimerasa (Boehringer Mannheim). Esta reacción se realizó varias veces.

NOTA: Para cuantificar y comprobar que el mRNA obtenido de la transcripción *in vitro* no se degrado, cada una de las reacciones se monitoreo en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% y se cuantifico con espectrofotómetro de absorción a 260nm.

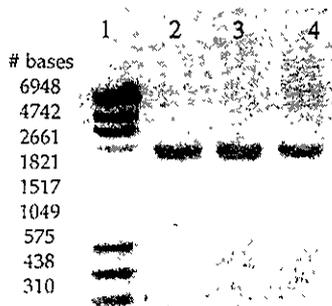


Figura 11 Gel de RNA mostrando la Transcripción *in vitro*
 Marcador de peso RNA (1); RNA del canal GIRK5 (2);
 RNA del canal mutado N129E (3) y K157E (4)

8. RESULTADOS ELECTROFISIOLOGÍA.

8.1 Expresión funcional de los canales.

Los registros se realizaron a partir de las 24 horas de la inyección con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (Voltage Clamp) utilizando como solución de registro una concentración de 118 mM de K^+ (Anexo III). Los experimentos de sensibilidad al Ba^{2+} externo, se llevaron a cabo en ovocitos que presentaban corrientes mayores de $5 \mu A$ a los $-160mV$. Esto se realizó con el objeto de minimizar el efecto de la corriente endógena presente en los ovocitos.

Los ovocitos inyectados con RNAm correspondiente a la mutante N129E, presentaban niveles de corriente similares a los ovocitos sin inyectar. Incluso tres días después de la inyección los niveles de corriente no aumentaron. Por lo anterior no se logró determinar la sensibilidad al Ba^{2+} externo de esta mutante. No se registraron ovocitos después de 3 días de la inyección ya que estos estaban muy dañados.

8.2 Sensibilidad de los Canales al Bloqueo de la Corriente Inducida por Ba^{2+} Externo.

8.2.1 Relación corriente-tiempo.

En la figura 12 se muestra un ejemplo representativo de los registros obtenidos para el canal silvestre (Kir 3.5; figura 12: a, c y e) y para la mutante K157E (figura 12: b, d y f). Conforme se aumenta la concentración de Ba^{2+} externo, se observa que la corriente de la mutante K157E se inhibe más que el canal silvestre (comparar figura 12 c y d; e y f).

El nivel máximo de corriente promedio fue mayor al inicio del pulso comparándolo con el obtenido al final del pulso para el canal silvestre y el mutado. A los 8 ms de iniciado el pulso con cero Ba^{2+} externo a $-160 mV$ para el canal

silvestre, el nivel promedio de corriente fue de $-7.3 \pm 1.3 \mu\text{A}$ y a los 99 ms de iniciado el pulso fue de $-3. \pm 0.31 \mu\text{A}$ ($n=3$; figura 12a). Para la mutante K157E la corriente máxima promedio a -160mV fue de $-7.84 \pm 5.9 \mu\text{A}$ (8ms) y de $-3.266 \pm 1.613 \mu\text{A}$ ($n=5$, 99ms; figura 12b).

Al cambiar la solución externa con $75 \mu\text{M}$ de Ba^{2+} , el nivel de corriente al inicio del pulso para el canal silvestre a -160mV fue de $-4.94 \pm 0.56 \mu\text{A}$; al final del pulso fue de $1.9 \pm 0.02 \mu\text{A}$ ($n=3$; figura 12c). Para la mutante K157E el nivel de

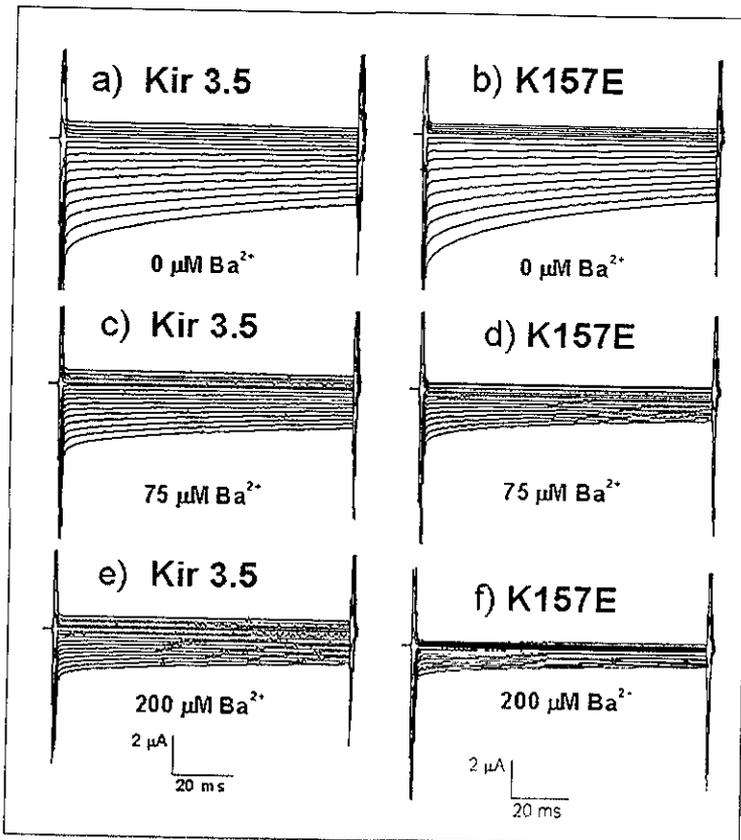


Figura 12 Curva corriente contra tiempo donde se observa el efecto del Ba^{2+} externo. Todos los registros se realizaron con 118mM de K^+ a y b) registro con cero Ba^{2+} externo, c y d) registro con $75\mu\text{M}$ de Ba^{2+} externo, e y f) registro con $200\mu\text{M}$ de Ba^{2+} externo

corriente promedio al mismo voltaje fue de $3.02 \pm 1.09 \mu\text{A}$ al inicio del pulso y de $1.45 \pm 1.64 \mu\text{A}$ al final del pulso ($n=5$; figura 12d). El nivel máximo de corriente disminuyó más del 50% para la mutante mientras que el canal silvestre disminuyó aproximadamente un 30%.

Al cambiar la solución externa por $200 \mu\text{M}$ de Ba^{2+} , el nivel máximo de la corriente para el canal silvestre a -160 mV fue de $-1.94 \pm 0.6 \mu\text{A}$ al inicio del pulso y de $-1.1 \pm 0.7 \mu\text{A}$ al final del pulso ($n=3$; figura 12e). Para la mutante K157E el nivel máximo de corriente registrada fue de $-1.1 \pm 0.106 \mu\text{A}$ al inicio del pulso y de $-0.85 \pm 0.02 \mu\text{A}$ al final del pulso ($n=5$; figura 12f).

8.2.2 .Inactivación de la corriente.

En la figura 12a y 12b se observan que la cinética de la corriente de la mutante K157E es similar al canal silvestre (Kir 3.5). En esta figura se observa que la inactivación de la corriente es diferente entre el canal silvestre y el canal mutante K157E. Para comprobar si la inactivación intrínseca del canal Kir 3.5 se modificó con la mutación introducida, para cada voltaje, se normalizó la corriente de los registros y se realizaron gráficas de la corriente normalizada en función del tiempo.

En la figura 13 se observa un ejemplo de la inactivación de la corriente a diferentes voltajes con cero Ba^{2+} externo. En esta figura se puede observar que la inactivación de la corriente para el canal silvestre es ligeramente diferente al canal mutante para los voltajes utilizados. Se observa que el canal Kir 3.5 se inactiva más pronto que el canal mutante en todos los voltajes (figura 13a, b, c y d).

Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre el canal silvestre y la mutante K157E para cada uno de los voltajes probados ($p > 0.05$, figura 13). Al comparar la inactivación a diferentes voltajes se encontraron diferencias significativas tanto para el canal silvestre como para la mutante K157E ($p < 0.01$; figura 13).

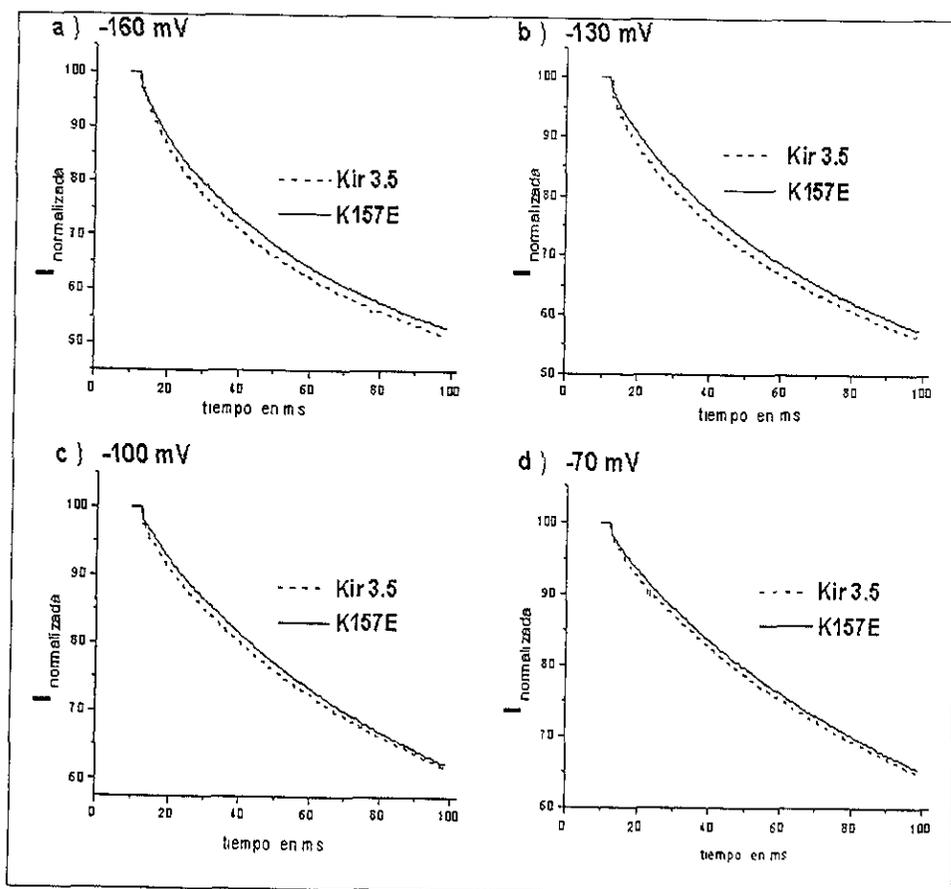


Figura 13. Grafica de la corriente normalizada contra tiempo a diferentes voltajes. a) a -160mV; b) -130mV;

Tabla 7: Constantes de inactivación del canal silvestre a diferentes concentraciones de Ba²⁺ externo.

[Ba ²⁺] mM	τ_1			τ_2		
	0	75	200	0	75	200
mV	24.2 ± 3.6	23.96 ± 1.2	24.95 ± 3.2	3.36 ± 0.2	3.60 ± 0.37	3.64 ± 0.21
-160	25.13 ± 2.1	27.16 ± 3.1	27.57 ± 2.5	3.18 ± 0.55	3.48 ± 0.48	3.82 ± 1.57
-145	26.16 ± 2.3	27.76 ± 0.6	25.77 ± 0.45	3.11 ± 0.33	3.20 ± 0.6	2.87 ± 0.67
-130	27.45 ± 1.5	29.96 ± 1.2	28.97 ± 0.99	3.1 ± 0.2	2.72 ± 0.48	2.49 ± 0.37
-115	28.73 ± 1.1	39.96 ± 3.2	36.48 ± 2.5	3.01 ± 0.36	3.87 ± 0.35	2.69 ± 0.37
-100	24.20 ± 1.08	23.96 ± 2.1	24.95 ± 3.6	3.36 ± 0.25	3.60 ± 0.57	3.64 ± 0.21

Los registros de la corriente contra el tiempo (figura 12 a y b) se ajustaron a una doble exponencial para obtener las constantes de inactivación, esto se realizó para las concentraciones de cero, 75 y 200 μ M de Ba²⁺ externo. En la tabla 7 se presentan las constantes de inactivación para el canal silvestre a diferentes voltajes y concentración de Ba²⁺ externo. En la tabla 8 se muestran las constantes de inactivación para la mutante K157E.

Al comparar las constantes de inactivación (τ_1 y τ_2) entre el canal silvestre y el mutado, no se encontraron diferencias significativas a ninguna concentración de Ba²⁺ externo ($p > 0.05$).

Tabla 8: Constantes de inactivación del canal mutante K157E a diferentes concentraciones de Ba²⁺ externo

[Ba ²⁺] mM	τ_1			τ_2		
	0	75	200	0	75	200
mV	24.65 ± 3.2	25.45 ± 1.38	27.54 ± 3.2	3.41 ± 0.35	3.70 ± 0.74	3.47 ± 0.32
-160	24.98 ± 2.1	26.08 ± 3.1	27.04 ± 3.6	2.82 ± 0.22	3.43 ± 0.06	3.11 ± 0.41
-145	27.75 ± 1.5	28.10 ± 2.0	25.60 ± 0.14	2.86 ± 0.12	3.31 ± 0.46	2.87 ± 0.54
-130	31.22 ± 2.1	30.43 ± 1.45	30.01 ± 0.22	2.87 ± 0.11	3.07 ± 0.45	2.74 ± 1.27
-115	33.69 ± 1.2	29.10 ± 0.71	27.78 ± 3.5	2.83 ± 0.09	3.07 ± 0.45	2.57 ± 0.51
-100	24.65 ± 1.7	25.45 ± 3.6	27.54 ± 2.6	3.41 ± 0.22	3.70 ± 1.6	3.47 ± 0.55

De la misma manera no se encontraron diferencias significativas en las constantes de inactivación al variar la concentración de Ba²⁺ externo ni en el canal silvestre (tabla 7; $p > 0.05$) ni para el canal mutante K157E (tabla 8; $p > 0.05$).

8.2.3 Relación corriente-voltaje.

Para observar si se presentan cambios en la relación corriente (I) contra voltaje (V) al inicio y al final del pulso, se realizaron las gráficas correspondientes a los 8 ms y 99ms de iniciado el pulso tanto para el canal silvestre (figuras 14a y 15a) como para la mutante K157E (figuras 14b y 15b).

En la figura 14 se graficaron los datos observados a los 8 ms de iniciado el pulso. El canal silvestre (14a) y el mutante (14b) son buenos rectificadores ya que se observa una corriente saliente mínima. Al aumentar la concentración de Ba^{2+} externo, el nivel de corriente entrante va disminuyendo dependiendo la cantidad de Ba^{2+} externo adicionado a la solución externa. No se observó que el Ba^{2+} afectara la corriente saliente (figura 14 a y b).

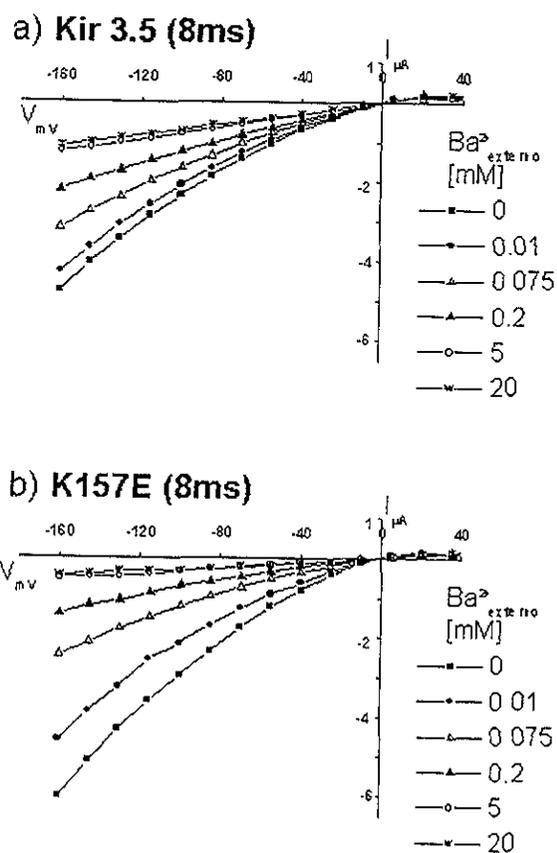


Figura 14. Curva I/V a los 8ms de iniciado el pulso. Se utilizaron diferentes concentraciones de Ba^{2+} externo. a) canal silvestre. b) canal mutante K157E.

En la figura 15 se graficaron los datos obtenidos a los 99 ms de iniciado el pulso. Al igual que a los 8 ms de iniciado el pulso, los canales son buenos rectificadores. El nivel de corriente observada es menor que a inicio del pulso. Al igual que en la figura 14 tanto para el canal silvestre (15a) como para el canal mutante (15b) al aumentar la concentración de Ba^{2+} externo, la corriente entrante va disminuyendo.

A una concentración de 20 mM de Ba^{2+} externo y un voltaje de -160 mV, el nivel de corriente remanente a los 8ms para el canal silvestre es de $-1.18 \pm 0.25 \mu A$

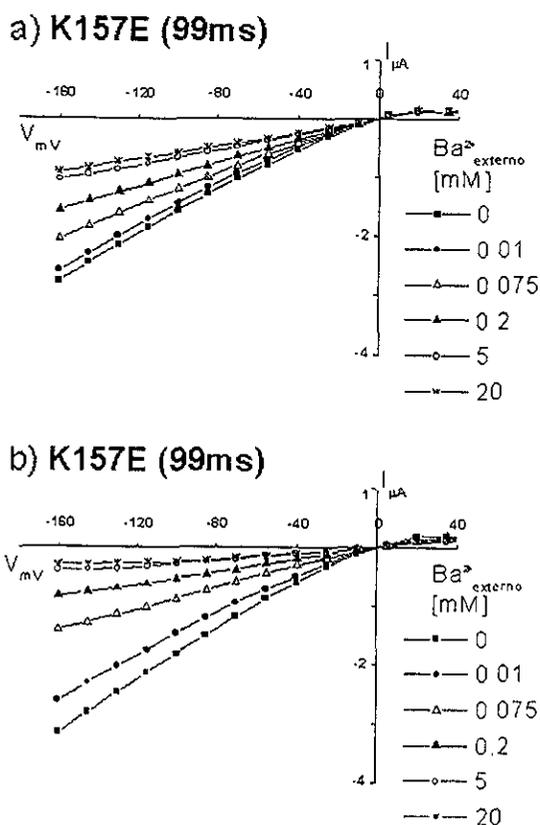


Figura 15 Curva I/V a los 99 de iniciado el pulso. Se utilizaron diferentes concentraciones de Ba^{2+} externo. a) canal silvestre b) canal mutante K157E

(n=3; figura 14a), mientras que para la mutante K157E es de $-0.44 \pm 0.015 \mu\text{A}$ (n=5; figura 14b). A los 99 mV al mismo voltaje y concentración de Ba^{2+} externo la corriente registrada para el canal silvestre es de $-0.91 \pm 0.022 \mu\text{A}$ (n=3; figura 15a) y para el canal mutado es de $-0.3 \pm 0.13 \mu\text{A}$ (n=5; figura 15b). Con los datos anteriores podemos inducir que el canal silvestre es menos sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo.

8.3 Obtención de la Kd

8.3.1 Kd al inicio del pulso

Para comprobar si efectivamente el la mutación introducida en el canal Kir 3.5 (K157E) afecta la sensibilidad al Ba^{2+} externo, se realizaron curvas dosis-respuesta utilizando únicamente los primeros 4 pulsos de voltaje que van de -160mV a -70mV y los datos se ajustaron con la ecuación logística y obtener la Kd (EC_{50}). Lo anterior se realizó para los datos obtenidos a los 8 ms y 99 ms de iniciado el pulso. Los datos para cada pulso se normalizaron restando la corriente observada a una concentración de 20 mM de Ba^{2+} externo y se dividiendo entre la corriente observada en ausencia de Ba^{2+} externo. Los datos se ajustaron con la ecuación logística utilizando el paquete Micrococcal origin 5.0 y los valores de Kd obtenidas se muestran en la tabla 9.

En la figura 16 se muestra un ejemplo de la curva dosis respuesta al inicio del pulso para el canal silvestre y para la mutante K157E. En esta gráfica se observa que el canal silvestre (figura 16a; tabla 9) es menos sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo respecto a la mutante K157E (figura 16b; tabla 9). Al inicio del pulso la mutante K157E resultó ser más sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo ($p < 0.01$).

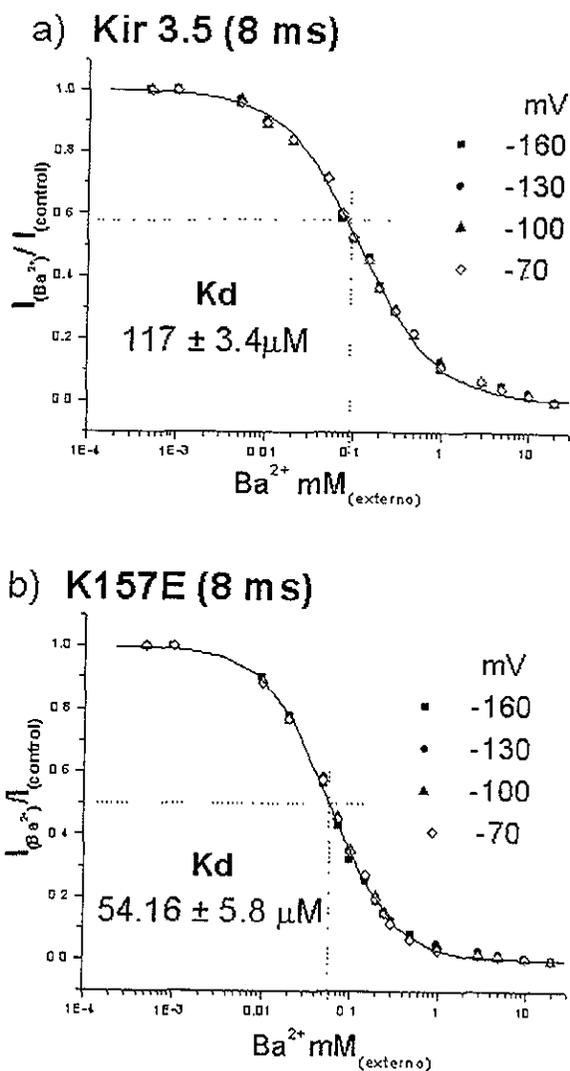


Figura 16. Curva dosis respuesta a los 8 ms de iniciado el pulso. a) canal silvestre. b) canal mutante K157E. se graficaron 4 voltajes y se ajustaron con el paquete Micrococcal Origin 5.0

Para probar que este el bloqueo de la corriente dependía del voltaje, se realizaron curvas dosis respuesta donde se graficó la corriente normalizada a -160

mV y a -70 mV (figura 17). No se encontraron diferencias significativas entre los voltajes probados para el canal silvestre (figura 17a; $p > 0.05$) ni para el canal

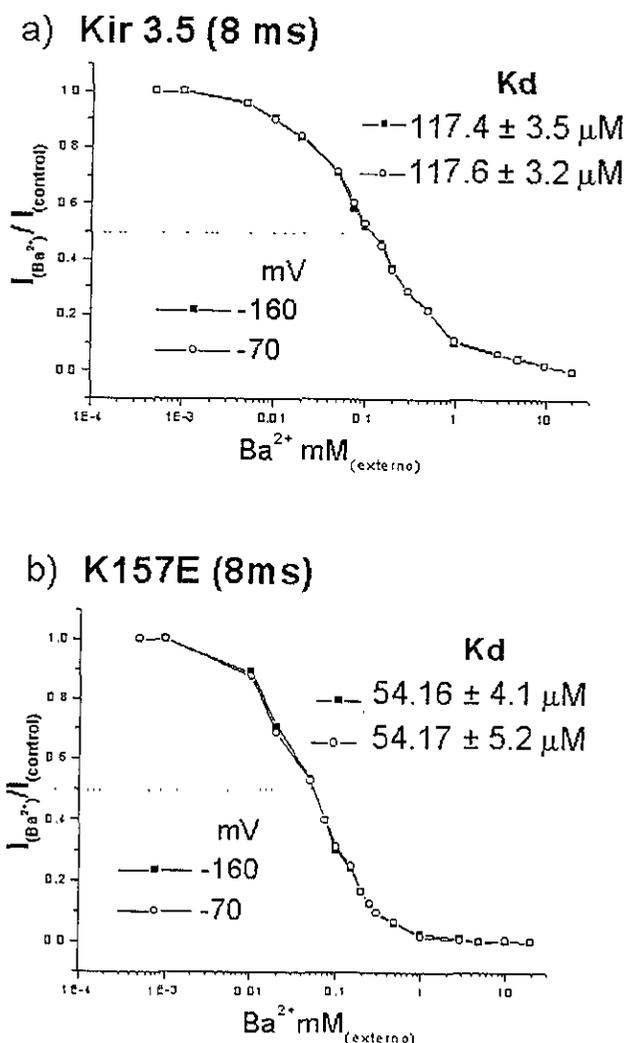


Figura 17 Curva dosis respuesta a los 8 ms de iniciado el pulso. a) canal silvestre, b) canal mutante K157E. Los datos no fueron ajustados

mutante K157E (figura 17b; $p > 0.05$)

8.3.2 Kd al final del pulso

Para observar si la Kd se modificaba al final del pulso, se realizaron curvas dosis respuesta utilizando los datos normalizados a los 99ms de iniciado el pulso

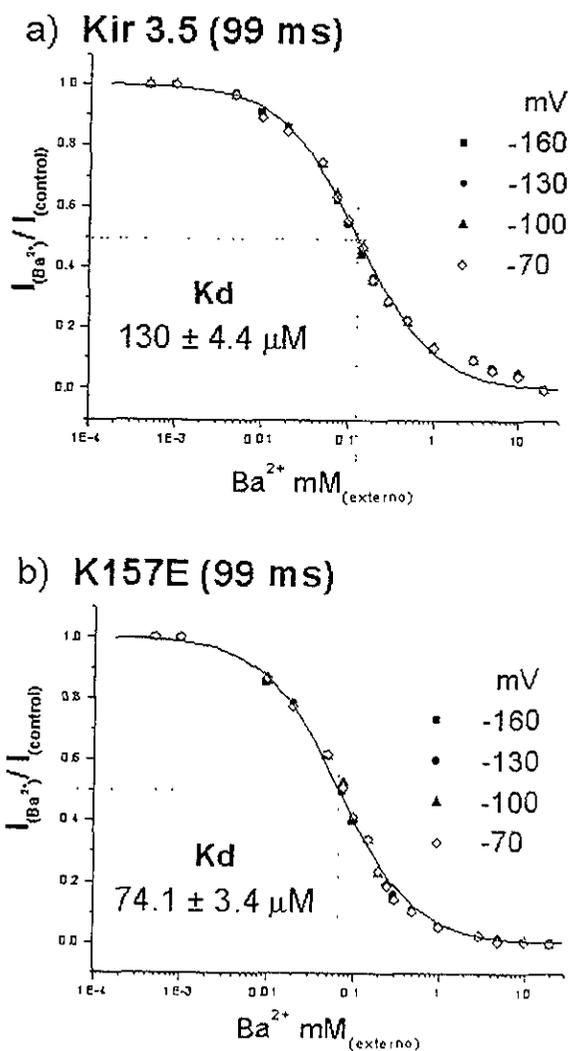


Figura 18: Curva dosis respuesta a los 99 ms de iniciado el pulso a) canal silvestre b) canal mutante K157E. Se graficaron 4 voltajes y se ajustaron con el paquete Micrococcal Origin 5.0

(figura 18). Al igual que al inicio del pulso, se observa que el canal mutante K157E (figura 18b) es más sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo que el canal silvestre (figura 18a; tabla 9). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

Para probar si a este tiempo se presentaba una dependencia al voltaje realizaron curvas dosis respuesta similares a la figura 17. Al igual que a los 8 ms no se encontraron diferencias significativas entre $-160mV$ y $-75mV$ tanto para el canal silvestre ($p > 0.05$; figura 19a) como para el canal mutante ($p > 0.05$; figura 19b).

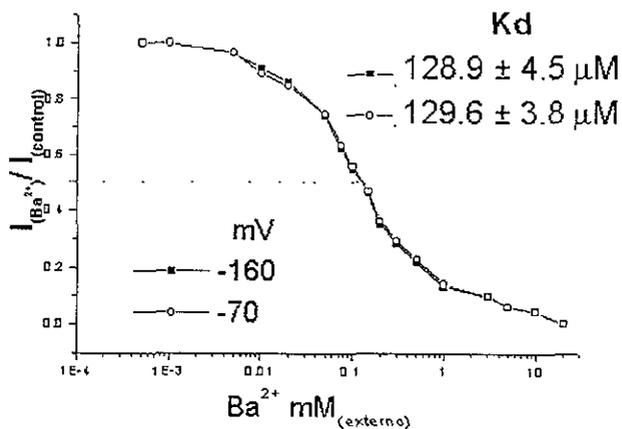
Tabla 9: Determinación de la K_d del bloqueo por Ba^{2+} externo.

	K_d 8ms	K_d 99ms	n
	[Ba^{2+}] μM		
Kir3.5 "silvestre"	117 ± 3.4	130 ± 4.4	3
K157E	54.16 ± 5.8	74.1 ± 3.4	5

En la tabla 9 se observa que la K_d obtenida a los 99 ms de iniciado el pulso es mayor que la obtenida a los 8ms. Esta diferencia es estadísticamente significativa en el canal silvestre y en el canal mutante K157E ($p < 0.01$).

Cabe mencionar que se realizaron algunos registros de la sensibilidad al Ba^{2+} externo utilizando como solución externa 20mM de K^+ externo (datos no mostrados) y no se encontraron diferencias en la K_d obtenidas con 118mM de K^+ externo (tabla 9).

a) Kir 3.5 (99ms)



b) K157E (99 ms)

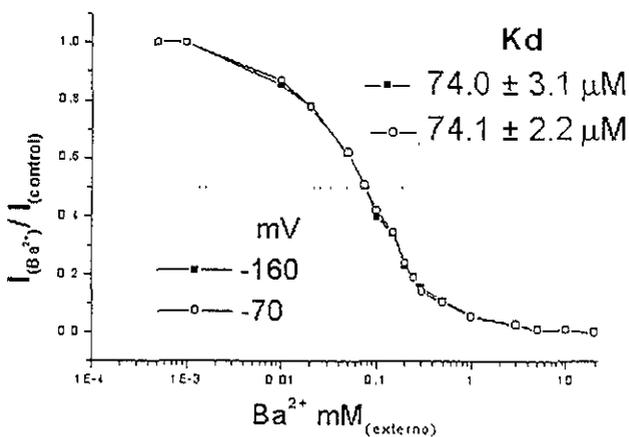


Figura 19 Curva dosis respuesta a los 99 ms de iniciado el pulso a) canal silvestre b) canal mutante K157E. Los datos no fueron ajustados

9. DISCUSIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR.

9.1 Obtención de los Canales Mutados.

La mutagénesis dirigida y recombinación por PCR es una técnica muy importante para el estudio de la relación estructura-función de las proteínas, expresión génica y modificación de vectores. Es por lo anterior que se optó por utilizar esta técnica para realizar las mutaciones puntuales en el canal Kir 3.5.

Al realizar las primeras reacciones de amplificación (esquema 4: PCR1 y PCR2) se pudo observar que los iniciadores mutantes se unieron eficientemente al DNA molde correspondiente al canal silvestre (Kir3.5), esto se debe a que sólo 3 bases de las 19 que conforman los iniciadores mutantes difieren de la secuencia normal del canal. Las 16 bases restantes que hibridan con el canal silvestre son suficientes para mantener estable este híbrido y por lo tanto proveer el extremo libre OH^{3'} necesario para que la polimerasa sintetice el DNA.

En la segunda reacción de amplificación (esquema 4: PCR3), se utilizaron como molde los fragmentos obtenidos en la primera reacción de amplificación (Figuras: 1, 4a, b y c). Esta recombinación de los fragmentos se debe a que estos comparten una secuencia de 19 bases, siendo suficientes para que hibriden y la polimerasa actúe y complete la secuencia del canal. Este principio de recombinación fue primeramente utilizado por Mullis et al (1986), en cuyo trabajo muestra que la PCR es una herramienta útil para ensamblar iniciadores (oligonucleótidos) sobrelapados y reconstruir íntegramente secuencias de DNA sintético que pueda ser obtenido a partir de síntesis *in vitro*.

En la figura 2 y 3 se observan además de la banda de 1200 pb dos bandas de menor peso. Estas bandas podrían deberse a una amplificación de los fragmentos obtenidos en la primera PCR. Como se adicionaron los iniciadores XIRPBF 5' y 3', estos pudieron unirse a los fragmentos que no se hibridaron entre si y de esa

manera amplificar los fragmentos. No se descarta la posibilidad de que estas bandas sean producto de un exceso de iniciadores.

En las reacciones de PCR de las figuras 2 (carril *), 3 (carril *) y 5a (carriles *) únicamente se colocaron como DNA molde, los fragmentos obtenidos de la primera PCR. En estos geles no se observa ninguna banda de 1200 pb que corresponda al canal mutado N129E o K157E. Esto se debe a la poca cantidad del DNA molde que se agrego de cada fragmento obtenido en la PCR1 y PCR2 (Esquema 4; ~10 ng de c/u en 50 μ l) y al no adicionarse iniciadores a los extremos, el DNA de 1200 pares de bases que se logro formar, no se amplificó. Por lo tanto, la cantidad máxima de DNA esperada para esta reacción es de 0.25ng/ μ l; de esta reacción se cargaron a los geles 5 μ l. Debido a la baja concentración de DNA, es difícil identificar una banda de 1200pb en geles de agarosa al 1%.

Para probar que la ausencia de banda se debe a la poca cantidad de DNA molde utilizado en esas reacciones, se realizó una prueba de PCR en la cual se añaden en exceso los fragmentos obtenidos de la PCR primaria de cada una de las mutantes (~400ng; figura6). Si comparamos las bandas obtenidas en el gel de la figura 6 en el cual se cargaron 20 μ l de la reacción de recombinación (figura 3: PCR3 sin iniciadores), con las obtenidas en los geles de las figuras 2 (carril *), 3 (carril *) y 5a (carriles *), en donde se colocaron 10ng de cada mega oligo con iniciadores a los extremos (esquema 4: PCR3), observamos que se obtiene mas DNA al agregar los iniciadores a los extremos que al aumentar la concentración de los fragmentos adicionados en la PCR combinatoria. Con esta reacción de PCR comprobamos que no es necesaria agregar iniciadores a los extremos en la reacción de PCR combinatoria para poder obtener la secuencia completa del canal, pero si son indispensables para obtener mas copias y aumentar el rendimiento de la reacción de PCR.

9.2 Clonación de los canales mutados.

Después de obtener el canal mutado y ligarlo al vector PBF, al purificarlo se puede observar en el gel de la figura 7 que el canal BIR11, el canal silvestre y los mutantes, no se observa una sola banda correspondiente al peso esperado sino que se presentan varias bandas. Se ha mencionado que el DNA circular presenta diferentes grados de enrollamiento y en un gel de DNA por lo menos se observan tres bandas (Lewin, 1996).

Al realizar la digestión enzimática del DNA con enzimas que linearizan al canal se observó una sola banda correspondiente al peso esperado del canal con el inserto (figura 8b). Por lo anterior, las bandas que no corresponden al peso esperado del gel se deben al grado de enrollamiento del DNA circular y no a una contaminación.

Al digerir los canales mutados con enzimas de restricción se comprobó que los canales mutados se insertaron en la dirección esperada, esto se debe a que las enzimas utilizadas para ligar al canal mutado con el vector, forman extremos cohesivos específicos; esto incrementa la probabilidad de que el fragmento se ligue al vector en la dirección esperada (Lewin, 1996). Al hacer el ensayo de digestión enzimática, los pesos observados corresponden a los pesos esperados (figura 8 a y b). Con estas reacciones se comprobó además que no se introdujo alguna mutación en las secuencias consenso de las enzimas de restricción que pudiera afectar la reacción.

Posteriormente, al secuenciar todo el fragmento de DNA correspondiente a los canales mutados, se pudo comprobar que no aparecen cambios adicionales en la secuencia del DNA que pudieran afectar la secuencia del canal o el marco de lectura, únicamente se observó el cambio de bases esperado (figuras 9 y 10). Esto se debe en parte a que para las reacciones de amplificación se utilizó el kit Expand™ (Boehringer Mannheim) que contiene un conjunto de enzimas con mayor fidelidad que la Taq polimerasa convencional (Barnes, 1994).

Se ha mencionado que la eficiencia de la técnica de mutagénesis dirigida y recombinación por PCR es mayor del 80%, estos datos concuerdan con los obtenidos, ya que para la mutante N129E, las tres muestras secuenciadas contienen la mutación, mientras que para la mutante K157E solo 2 muestras contienen la mutación (Erlich, 1992; Zhu, 1992, 1997).

10. DISCUSIÓN ELECTROFISIOLOGIA

10.1 Expresión funcional de los canales.

Como se mencionó en los resultados, no se logró registrar la expresión de mutante N129E.

Navaratnam et al. (1995) clonaron un canal de K^+ rectificador entrante (Kir 2.1; cIRK1) poco sensible al Ba^{2+} comparado con su homólogo de ratón mIRK1. Al mutar este canal en el residuo 125(Q) por un residuo de aspartato (E), encontraron que este residuo es importante para controlar la conductancia del canal y, además, altera la sensibilidad al Ba^{2+} externo, incrementando ambas propiedades. Este sitio es homólogo al sitio 129 de nuestro canal Kir3.5, donde por el contrario no se registró corriente alguna. Esto posiblemente se deba a que este residuo tenga un efecto contrario al observado en el canal cIRK y tal vez se indujo un cambio de conformación que haya afectado su conductancia o algún evento de señalización. Otra posibilidad es que el canal no haya logrado integrarse a la membrana y por lo tanto no expresar corriente alguna.

Por otra parte, para el canal silvestre y para la mutante K157E se registraron niveles de corrientes suficientes para hacer los ensayos de sensibilidad al Ba^{2+} externo (más de $5\mu A$)

10.2 Rectificación e inactivación.

En la figura 12 se observa que cinética de la corriente tanto del canal silvestre como de la mutante son muy similares, al obtener las constantes de inactivación se comprobó que no existen diferencias significativas entre éstos ($p > 0.05$; figura 13; tablas 7 y 8). Por lo anterior se concluye que la mutación no afectó la inactivación intrínseca del canal Kir 3.5. De igual manera se observó que el Ba^{2+} externo tampoco afecta la inactivación (tablas 7 y 8).

El canal Kir 3.5 y la mutante K157E son buenos rectificadores ya que se observa que la corriente saliente a potenciales positivos respecto al E_K en estos ensayos es mínima tanto al inicio del pulso ($E_{K-160mV}=0$; figura 14) como al final de éste ($E_{K-160mV}=0$; figura 15). Además se observó que el Ba^{2+} externo no afecta la rectificación ya que en las figuras 14 y 15 se observa que aún en presencia de altas Ba^{2+} externo el canal Kir3.5 y la mutante K157E no se observa un aumento en la corriente saliente.

10.3 La Mutación N157E Afecta el Bloqueo de la Corriente Inducido por Ba^{2+} Externo

Se ha mostrado que los cationes extracelulares que normalmente no se encuentran presentes en el fluido extracelular tales como el Ba^{2+} , bloquean los canales rectificadores entrantes de una manera dependiente de voltaje y de tiempo. Zhou et al. (1996) hicieron mutaciones en el canal Kir1.2 en la región del poro, para identificar los sitios involucrados en la sensibilidad al Ba^{2+} externo. Encontraron que al cambiar la V121 por un residuo de T, la sensibilidad al bloqueo por Ba^{2+} aumentó y depende de voltaje en el canal Kir 1.2. Este residuo es importante en la sensibilidad al Ba^{2+} externo. Cabe mencionar que este residuo T se encuentra presente en el canal Kir 3.5 en una posición homóloga. Para el canal Kir2.1 se han realizado varios estudios donde se muestra que la sensibilidad de este canal al Ba^{2+}

externo es voltaje dependiente ya que mientras más negativo sea el voltaje aplicado, el bloqueo es mayor (Kubo, et al., 1993; Owen et al. 1999).

Semejantes observaciones se han encontrado para el canal Kir1.1 (ROMK1), donde muestran que el bloqueo por Ba^{2+} externo depende de voltaje, aunque su sensibilidad es menor (Löffler y Hunter, 1997)

Zang et al. (1995) investigaron el bloqueo por Ba^{2+} externo en el canal de potasio muscarínico (Kir 3.1/3.4) en células de aurícula de cobayos, encontraron que el bloqueo por este ión era voltaje dependiente y que la K_d a $-80mV$ resulto ser de $15\mu M$. Esta K_d es menor a la reportada por Krapivinsky et al. (1994; $K_{d,80} = 500\mu M$). Owen et al. (1999) a su vez, mostró que el Ba^{2+} externo bloquea los canales Kir2.1 y Kir3.1/3.4 con gran afinidad, encontrando que los valores de K_d varían en el rango de $10\mu M$ a $20\mu M$ y el bloqueo depende del voltaje. Si se compara la curva dosis respuesta obtenida por Owen et al (1999; figura 20) para el canal Kir2.1, con las curvas de las figuras 17 y 19, claramente se puede observar que el bloqueo por Ba^{2+} externo para el canal Kir3.5 y para la mutante K157E, no depende del voltaje como sucede con los otros canales pertenecientes a esta gran subfamilia Kir. Esto sugiere que el canal Kir3.5 y las mutantes, a diferencia de aquellos en los que el bloqueo por Ba^{2+} externo depende del voltaje, sugiere que

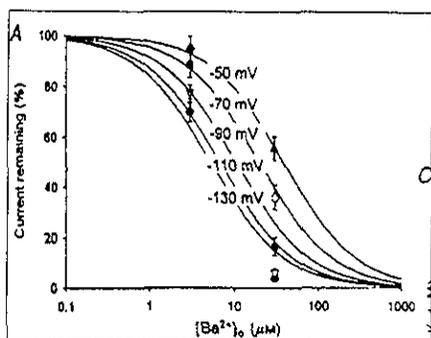


Figura 20. Curva dosis respuesta. Efecto del Ba^{2+} externo para el canal Kir2.1 en un ensayo utilizando 90 mM de K^+ externo (Owen et al 1999)

los iones bloquean en un sitio externo sin ingresar al poro del canal, permanecen en el vestíbulo de este.

En los estudios realizados sobre el bloqueo del Ba^{2+} externo en canales Kir, los registros se analizan al final del pulso, esto se debe a que se ha observado que en la corriente endógena de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* al inicio del pulso es independiente del voltaje mientras que el bloqueo a los 80 ms de iniciado el pulso el bloqueo por Ba^{2+} externo resultó dependiente de voltaje (Gamboa et al., 1997). Nuestros resultados muestran que tanto al inicio (8ms) cómo al final del pulso (99ms), el bloqueo por Ba^{2+} externo no depende del voltaje (figuras 17 y 19)

Desafortunadamente no se logró registrar funcionalidad alguna de la mutante N129E, pero los resultados obtenidos con la mutante K157E, demuestran que al cambiar el residuo de lisina (K; positivo) por un residuo de aspartato (E; negativo) en la posición 157 aledaña al poro, la sensibilidad al Ba^{2+} externo se incrementó significativamente tanto al inicio del pulso ($p < 0.01$; figura 16b), como al final de éste ($p < 0.01$; figura 18b) respecto al canal silvestre (tabla 5; figuras 16a y 18a).

La K_d observada a los 8 ms estadísticamente resultó ser menor que la observada a los 99 ms de iniciado el pulso ($p < 0.01$; tabla 9). Esto puede deberse a una mayor influencia de la corriente endógena de los ovocitos; ya que como la corriente del canal Kir3.5 se inactiva con el tiempo, la fracción de la corriente endógena del ovocito que es menos sensible al Ba^{2+} externo, esto puede deberse. No se encontraron diferencias significativas entre la K_d al inicio del pulso (8ms) y al final de este (99 ms tabla 9; $p < 0.01$).

Es bien sabido que los residuos de amino ácidos cargados negativamente pueden formar sitios de unión a cationes, por el contrario, residuos de aminoácidos cargados positivamente, repelen a los cationes. Para la mutante K157E, el cambio de un aminoácido cargado positivamente que repele la unión al Ba^{2+} , por un aminoácido negativo que atrae al Ba^{2+} externo, es la causa principal por la cual la mutante K157E resultó ser significativamente más sensible al Ba^{2+} externo respecto al canal silvestre.

En un ensayo de sensibilidad al Ba^{2+} externo con la mutante K157E, utilizando 20mM de K^+ en la solución externa se encontró una K_d similar a la observada con 118mM de K^+ ($n=1$; datos no mostrados). Es necesario realizar más ensayos del bloqueo de la corriente inducida por Ba^{2+} externo variando la concentración de K^+ en la solución externa ya que se ha mencionado que al variar las concentraciones de K^+ externo, se modifica el bloqueo por Ba^{2+} externo (Owen et al. 1999). Nuestros datos no son lo suficientes para concluir si verdaderamente el K^+ externo afecta el bloqueo por Ba^{2+} externo.

Por último, es conveniente hacer unas pruebas de identificación proteica como el "western blot" para identificar si la mutante N129E, se queda en la parte soluble (citósol) formando cuerpos de inclusión o llega a nivel de la membrana plasmática y no es funcional.

11. CONCLUSIONES

La técnica de mutagénesis dirigida y recombinación por PCR, es una herramienta muy útil y eficiente para introducir mutaciones específicas.

Son suficientes 19 bases compartidas para que se lleve a cabo la recombinación del DNA en la reacción de PCR combinatoria.

Los iniciadores en la reacción de PCR combinatoria, son necesarios para aumentar el rendimiento de esta reacción de PCR.

La mutante K157E es más sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo.

El bloqueo de la corriente inducido por Ba^{2+} externo tanto para la mutante K157E como para el canal silvestre, no dependen del voltaje.

La mutación K157E no afectó la rectificación ni la inactivación intrínseca del canal Kir 3.5.

El Bloque de la corriente inducida por Ba^{2+} externo no afecta la inactivación del canal Kir3.5 ni de la mutante K157E.

Literatura citada

- Adley DJ. y Standfield PR. 1996. Ion Channels. Cambridge, University Press. 307 pp.
- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts. y Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Graland Publish., Inc. New York.1294pp.
- Armstrong C.M y Bezanilla F. 1973 . Currents Related to Movement of the Gating Particles of the Sodium channels. *Nature* 242:459-461.
- Armstrong, C.M., R.P. Swenson, and S.R. Taylor. 1982. Block of squid axon K⁺ channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen. Physiol.* 80:663-682.
- Ashcroft FM. 1999. Ion channels and disease. Academic Press.
- Ashen, M. D., O'Rourke, B. & Kluge, K. A. 1995. Relatively high frequency. Allelic variations and, inward rectifier K⁺ channel from human heart and particular, repeat or silent polymorphisms have pre-brain: cloning and stable expression in a human cell previously described for other genes of the Kir line. *American Journal of Physiology* 268, H506-
- Barnes W M. 1994. PCR Amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 2216-20.
- Bauer Ch K. Falk T Schwarz. 1996. An endogenous inactivating inward rectifier K⁺ current in oocytes *Xenopus laevis* . *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 432: 812-20
- Becker, W. M., Reece, J. B. y Poenie, M. F 1996. *The World of the Cell*. The Benjamin/Cummings Publish Company. USA. pp 229-243.
- Bezanilla, F. y Stephani E.1994 Voltage dependent gating of ionic channels. *Annu. rev. Biophys. Biomol. Structur.* 23:819-40
- Bezanilla, F., and C.M. Armstrong. 1972. Negative conductance caused by the entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.* 60:588-608.
- Bond, Ct., Pessia M, Xia XM., Lagruta A. Y Aldeman Jp., 1994 Cloning and Expression of a family potassium Channels. *Receptor and Channels* 2 (3): 183-191.
- Chen TRJ. Prestwich GD. y Logothetis DE. 1999. Distinct specificities of inward rectifying K⁺ channels for phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 274(51):36065-72.
- Corey S y Clapham DE. 1998. Identification of Native Atrial G-protein-regulated Inwardly Rectifying K⁺ (GIRK4) Channel Homomultimers. *J. Biol. Chem.* 273(42): 27499-27504
- Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D.E. 1998. Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K⁺ channel, *I_{KACH}*. *J. Biol. Chem.* 273:5271-5278
- Doupnik, C.A., N. Davidson, and H.A. Lester. 1995. The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin Neurobiol.* 5:268-277.

- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A. Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. y MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- Duprat, F., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Hugnot, J.P., Bigay, J., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. 1995. Heterologous mul-timeric assembly is essential for K⁺ channel activity of neuronal and cardiac G-protein-activated inward rectifiers. *Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 212:657-663
- Erlich H.A. 1992. PCR Technology. WH Freeman and Company N.Y. 246 pp.
- Gamboa R. 1995. Caracterización de una corriente endógena rectificadora entrante de K⁺ en ovocitos de la rana *Xenopus Laevis*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina UNAM.
- Gamboa R. Martínez M. Cumming E. 1998. Bloqueo del ion Bario sobre una corriente de potasio rectificadora entrante en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 68:206-213.
- Gilbert D.L. y Ehrenstein G. 1969. Effect of Divalent Cation on Potassium Conductance of Squid Axon. *Biophysics J.* 9: 447-63.
- Gildas Loussouarn Elena N. Makhina Thierry Rose , and Colin G. Nichols. 2000. Structure and Dynamics of the Pore of Inwardly Rectifying KATP Channels *J. Biol. Chem.* 275(2):1137-1144
- Hagiwara S. y Yoshii M. 1979 Blocking effect of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J. Physiol.* 292: 251-256.
- Hedin, K.E., Lim, N.F., Clapham, D.E. 1996. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of I KACH currents in oocytes. *Neuron* 16:423-429
- Heginbotham, L., T. Abramson, and R. MacKinnon. 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as re-vealed by mutant K⁺ Channels. *Science.* 258:1152-1155.
- Heginbotham, L., Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66: 1061-1067.
- Hille, B. 1992 en: *Ionic Channels in Excitable Membranes*, 2nd edn., pp. 127-130, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ho IHM. y Murrell-Lagnado RD. 1999. Molecular determinans for sodium-dependent activation of G protein gated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 274(13): 8639-48.
- Ho K., Nichols C.G., Lederer W.J., Lytton J., Vassiley P.M., Kanizirska M.V. y Hebert S. C., 1993. Cloning and Expression of an Inward Rectifying ATP-Regulated Potassium Channel. *Nature*, 362: 31-38.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbg *Nature*, 391.803-806.

- Huang, C. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1997). Binding of the G-protein $\beta\gamma$ subunit to multiple regions of G-protein gated inward rectifying K^+ channels. *FEBS Lett.* 405(3): 291-298
- Hurts R. S. Toro L. y Estefani E. 1996. Molecular Determinants of External Barium Block in Shaker Potassium Channels. *FEBS Letters* 388:59-65.
- Inagaki N., Tsuura Y.BN., Namba N., Masuda K. Y Gonoi T. 1995. Cloning and Functional Characterization of a Novel ATP Sensitive Potassium Channel Ubiquitously Expressed in rat Tissues, including Pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle and heart. *J. Biol. Chem.* 270:5691-5694.
- Inanobe A., Ito H., Ito M., Hosoya Y, Kurachi Y. 1995 Immunological and Physical Characterization of the brain G protein gated potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:1238:44.
- Inanobe, A., Yamada, M., Ishii, M., Tada, Y., Satoh, E., Hata, Y., Takai, Y., y Kurachi, Y 1999. Characterization of G-protein Gated Channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 19:1006-17
- Jan LY, Jan YN. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* 20:91-123.
- Katz, B. 1949. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2:285-299.
- Koyama, H., K. Morishige, N. Takahashi, J.S. Zanelli, D.N. Fass, and Y. Kurachi. 1994. Molecular cloning, functional expression and localization of a novel inward rectifier potassium channel in the rat brain. *FEBS Lett.* 341:303-307.
- Krapivinsky G. Gordon EA: Wickman K., Velimirovic Clapham De 1995. The protein G gated atrial K^+ Channels IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ Channels protein. *Nature* 374:135-141.
- Krapivinsky, G., Kennedy, M., Nemej, J., Medina, I., Krapivinsky, L., Clapham, D. 1998. G $\beta\gamma$ binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K^+ channel activation. *J. Biol. Chem.* 273:16946- 16952
- Kubo, Y., E. Baldwin TJ., Jan, and L.Y. Jan. 1993a. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* 362:127-33.
- Kubo, Y., E. Reuveny, P.A. Slesinger, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1993b. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature.* 364:802-806.
- Kubo. Y. 1994. Towards The Elucidation of the Structural-Functional Relationship of Inward Rectifying K Channel Family. *Neuroscience Research* 21:109-117.
- Leonard JP. Nargeot J., Snutch TP., Davison N. y Lester H.A. 1987. Ca^{2+} Channels Induced in *Xenopus* oocytes by rat Brain mRNA. *J. Neurosci.* 7: 875-81.
- Lesage, F., F. Duprat, M. Fink, E. Guillemare, T. Coppola, M. Laz-dunski, and J.P. Hugnot. 1994. Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K^+ channels in the brain. *FEBS Lett.* 353:37-42

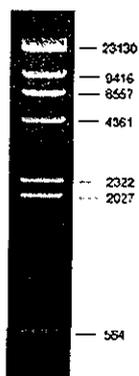
- Liao, Y.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 1996. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in Weaver brain. *J. Neurosci.* 16:7137-7150
- Löffler K y Hunter M. 1997. Cation Permeation and Blockade of ROMK1, a cloned renal potassium channel. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 434:151-158.
- Lopatin AN. Makhina AM. Y Nichols CG. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanisms of intrinsic rectification. *Nature* 372: 366-369.
- Loussouarn G. Makhina EN. Rose T. y Nichols CG. 2000. Structure and Dynamics of the Pore of Inwardly Rectifying KATP Channels. *J. Biol. Chem.* 275(2): 1137-1144.
- MacKinnon R. 1991. Determination of the Subunit Stoichiometry of a Voltage Activated Potassium Channel. *Nature* 350: 232-235.
- Makhina, E. N., A. J. Kelly, A. N. Lopatin, R. W. Mercer, and C. G. Nichols. 1994. Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier K channel. *J. Biol. Chem.* 269: 20468-20474.
- Matsuda H. 1988. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells *J. Physiol.* 397: 237-258.
- Miledii R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R Soc. (Lond).* 215: 491-97
- Miledii R. Parker I. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. of Physiol. (Lond).* 357: 173-83.
- Morishige, K., N. Takahashi, A. Jahangir, M. Yamada, H. Koyama, J.S. Zanelli, and Y. Kurachi. 1994. Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett.* 346:251-256.
- Mullis K Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction. *CSH Symp. Quant. Biol.* 263-273.
- Navaratnam D.S., Escobar P.L., Covarrubias M. y Oberholtzer C. 1995. Permeation Properties and Differential Expression across the auditory Receptor Epithelium of an Inward Rectifier K⁺ Channel Cloned from the chick Inner Ear. *J. Biol. Chem.* 270(33) 19238-45.
- Newman EA. 1993. Inward rectifier potassium channels in retinal glial (Muller) cell. *J. Neurosci.* 13: 3333-45
- Nichols CG. y Lopatin AN. 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171-91.
- Nichols CG, Lederer WJ. 1991. ATP-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.* 231: H1675-86
- Owen J.M. Quinn C.C. Leach R. Findlay J.B.C. y Boyett M.R., 1999. Effect of extracellular Cations on the Inward rectifying K⁺ Channels Kir 2.1 and Kir 3.1/Kir 3.4. *experimental Physiol.* 84: 471-488

- Parker I y Miledii R. 1987. Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Currents in Native *Xenopus* Oocytes. Proc. Royal. Soci. (Lond) B232: 289-96.
- Parker I, e Ivorra I . 1990. A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis* Proc R Soc Lond B Biol Sci 22:238(1293):369-381
- Partiseti M., Collura V., Agnel, M. Culouscou, J.M. y Graham D. 1998 Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. FEBS Letters 434:171-176
- Pessia, M., Tucker, S.J., Lee, K., Bond, C.T. and Adelman, J.P. 1996. EMBO J. 15, 2980-2987.
- Pongs O., 1993. Shaker Related K⁺ Channels. Sem in the Neurosciences. 5: 93-100.
- Rudy, B. 1988. Diversity And Ubiquity Of K Channels. Neuroscience. 25(3): 729-749.
- Sakura H. Ämmälä C. Smith PA Gribble FM Ashcroft FM 1995. Clonning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. FEBS letters 377:338-44
- Salvatore L, D'Adamo M C, Polishchuk R, Salmona M, Pessia M. 1999, Localization and age-dependent expression of the inward rectifier K⁺channel subunit Kir 5.1 in a mammalian reproductive system. FEBS Letters 449:146-152
- Sambrook, J., Fritsch E.F. y Maniatis T, 1989, Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, CHS. No. 1, 2 y 3.
- Shieh R. C. Chang J.C. y Arreola J. 1998. Interaction of Ba²⁺ with tha Pores of the Cloned Inward Rectifier K⁺ Channels Kir 2.1 Expressed in *Xenopus* Oocytes. Biophysical J. 75: 2313-22.
- Silverman, S. K., H. A. Lester, and D. A. Dougherty. 1996. Subunit stoichiometry of a heteromultimeric G protein-coupled inward-rectifier K 1 channel. *J. Biol Chem.* 271:30524 -30528.
- Sui, J. L., Chan, K. W., and Logothetis, D. E. 1996. Na⁺ activation of the muscarinic K 1 channel by a G-protein-independent mechanism. *J. Gen. Physiol.* 108 381-391.
- Sui, J. L., Petit Jacques J, y Logothetis, D. E. 1998. Proc. Nat Acad. Sci. 95: 1307-12.
- Swanson R., 1993. Introduction: Potassium Clannels. Seminars in the Neurosciences. 5: 77-78.
- Tagliatela M., Wible B. A., Caporaso R. y Brown B. M. 1994. Specification of Pore Propierties by Carboxil Terminus of Inward Rectifying Channels. Science 264: 844-847
- Takahashi, N., Morishige, K.I., Jahangir, A., Yamada, M., Findlay, I., Koyama, H. And Kurachi, Y. 1994. Molecular cloning and Functional Expression of cDNA Encoding a Second Clas of Inward Rectifier Potassium Channels in the Mouse Brain. *J. Biol. Chem.* 269 (37):23274-9

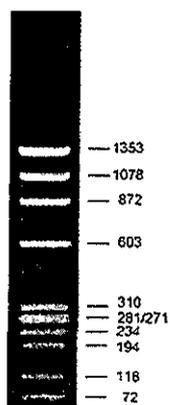
- Tinker, A., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 1996. Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell*. 87:857- 868.
- Vergara, C., and R. Latorre. 1983. Kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca²⁺ and Ba²⁺ blockade. *J. Gen. Physiol.* 82:543-568.
- Weiner MP, Gackstter T, Costa GL, Bauer JC, y Kretz KA. 1995. Site-directed Mutagénesis using PCR. <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/pcr-mut.html>.
- Werner, P., Hussy, N., Buell, G., Jones, K. A., and North, R. A. (1996). D₂, D₃, and D₄ dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 49: 656-661
- Yamada, M., Inanobe A, y Kurachi, Y. 1998. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* 50: 723-57.
- Yang, J., Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1995a. Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron*. 14:1047-1054.
- Yoshihiro Kubo a; *, Murata Yoshimichi a;b , Stefan H. Heinemann c 1998 Probing pore topology and conformational changes of Kir2.1 potassium channels by cysteine scanning mutagenesis *FEBS Letters* 435:69-73
- Zang, W.J., Yu X J, y Boyett M.R 1995 Barium block of the muscarínico Potassium Current in Guinea-Pig Atrial Cells. *Pflügers Arch.* 430: 438-57.
- Zhou , H., Chepilko, S., Schütt W., Choe H., Palmer L.G. y Sackin H. 1996. Mutations in the pore Region of ROMK Enhance Ba²⁺ Block. *Am. J. Physiol.* C1949-c1955
- Zhou, H., Tate, S.S. y Palmer L.G., 1994. Primary Structure and Functional Properties of an Epithelial K⁺ Channel. *Am. J. Physiol.* 266 (35): C809-C824.
- Zhu L. 1992 Highly Efficient Site-Directed Mutagenesis of dsDNA Plasmid. *CLONTECHniques VII*(1):1-15
- Zhu. L. 1997. *In vitro* Site Directed Mutagenesis Using The Unique restriction Site Elimination (USE) Method. *Methods in Mol. Biol.* 57:13-29.

Los marcadores de peso molecular (DNA) utilizados como referencia fueron los siguientes:

λ Marcador de Alto peso Molecular



ϕ Marcador de Bajo peso Molecular



Preparado a través de digerir λ DNA con Hind III (LIFE Technologies)

Preparado a través de digerir ϕ X174 RF DNA con Hae III (LIFE Technologies)

Los pesos moleculares correspondientes para cada banda están dados en pares de bases (pb)

▪ Preparación de células competentes

1. Incubar 5ml de medio LB (anexo medios) con una colonia bacteriana DH5 α , o con 10ml del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37 $^{\circ}$ C con agitación constante.
2. Incubar 20ml de medio LB con 0.2 ml del cultivo bacteriano del paso 1, a 37 $^{\circ}$ C con agitación constante.
3. Checar el crecimiento hasta que alcance una OD de 0.3 a 0.5. (aprox 3h)
4. Centrifugar a 4000rpm por 5 min a 4 $^{\circ}$ C en un tubo estéril.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 1ml de solución A fría. Llevar las células a un volumen final de 10ml con la solución A y centrifugar como en el paso 4. Decantar el sobrenadante
6. Resuspender el botón en 1ml de solución B fría. Llevar a un volumen final de 10ml con la solución B.
7. Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células como en el paso 4
8. Decantar el sobrenadante. Secar el tubo lo más posible
9. Muy suavemente resuspender las bacterias en 2ml de solución B.
10. Hacer alícuotas de 200 μ l y agregar 10% de glicerol estéril. Mezclar por inversión. Congelar estos stocks en hielo seco y almacenar a -70 $^{\circ}$ C

▪ Transformación.

1. Mezclar 200 μ l de células competentes con 0.05-0.5 μ g de DNA del plásmido
2. Incubar sobre hielo 30 min
3. Dar un shock térmico a 42 $^{\circ}$ C por 2 min.
4. Enfriar las células por unos segundos sobre hielo
5. Agregar 1 ml de LB sin antibiótico. Resuspender por inversión
6. Incubar a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora
7. Centrifugar a 2500 rpm a 4 $^{\circ}$ C por 5 min.
8. Decantar el sobrenadante
9. Agregar 200 μ l de LB y resuspender por inversión
10. Agregar 200 μ l de células a una caja de cultivo LB con ampicilina
11. Incubar a 37 $^{\circ}$ C toda la noche.
12. Checar colonias

▪ **Método de Lisis Alcalina**

- 1- Incubar a 37 °C toda la noche:
4ml de medio LB con antibiótico y 100 µl de las bacterias transformadas
- 2- Centrifugar a 5000 rpm 3.5 ml.
El restante se guarda con 50 µl de glicerol estéril .
- 3- Resuspender el botón en 100µl de la Sol. I
Transferir a un ependorf y dejar 5 min. a T ambiente.
- 4- Agregar 200 µl de sol II fresca, dejar 5 min. en hielo
- 5- Agregar 150 µl de la solución III y dejar 10 min. en hielo.
- 6- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C por 10 min
Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- 7- Agregar 1/10 volúmenes de tris-Hcl 1M pH8
- 8- Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo.
- 9- Vortex 15 seg.
- 10- Centrifugar a 14000 rpm 4 °C por 2 min.
Recuperar la fase de arriba.
- 11- Repetir paso 8.
- 12- Dejar mínimo 15 min. a -80 °C. Podemos dejar la noche entera.
- 13- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C por 10 min.
Decantar
- 14 - Lavar 1X con Etanol (500 µl al 70 -80%).
Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C por 3 min.
- 15- Secar lo mas posible.
- 16- Resuspender en 40 µl de H₂O o TE.
Nota: hay que mezclar por inversión los pasos 3,4

SOLUCIONES

SOL. I

Glucosa	50 mM
Tris-Hcl pH 8.0	25 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Preparar en 100 ml y esterilizar 15 min en autoclave.
Guardar a 4 °C.

SOL. II

	Conc. final	Stock	2ml
NaOH	0.2N	10 N	40 µl
SDS	1%	10%	200 µl
		H ₂ O	1.760 ml

Se prepara al momento y generalmente preparamos 2 ml

SOL. III

Acetato de potasio (5M)	60 ml
Ac acético glacial	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

El resultado final es 3M de K⁺ y 5M de acetato
Esta solución se guarda en hielo.

- Medio ND 96

	Stock	[] Final mM	1000 ml	500 ml
KCl	1 M	2	2 ml	1 ml
Hepes	1 M	5	5 ml	2.5 ml
Piruvato	1.25 M	2.5	2 ml	1 ml
NaCl	1M	96	96 ml	48 ml
MgCl	1 M	1	1 ml	0.5ml
*CaCl ₂	1 M	1.8	1.8 ml	0.9 ml
**Gentamicina			100 mg	50 mg

* Sólo para preparar ND96 con calcio.

** Sólo para preparar ND96 con calcio y gentamicina.

Se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza por filtración.

- Soluciones para preparar células competentes

Solución A	[mM]
MOPS pH7.0	10
Cloruro de Rubidio	10

Solución B	[mM]
MOPS pH 6.5	100
CaCl ₂	50
RbCl	10

Nota: Estas soluciones se preparan un día antes y se filtran para usarlas.

- Solución de registro alto potasio.

	mM
KCl	118
CaCl ₂	1.8
MgCl ₂	1
Hepes.	5
PH 7.3	

Para hacer los registros de sensibilidad al Ba²⁺ externo se tomo la solución de alto potasio y se agregaron las siguientes concentraciones de BaCl₂ mM: cero; 0.0005; 0.001; 0.01; 0.02; 0.05; 0.075; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3; 0.5; 1; 3; 5; 10 y 20.

- Medio LB 1X líquido / bacterias.

Bactotripton	10 g.	5 g
Extracto de levadura	5 g	2.5 g
NaCl	10 g	5 g
Aforar con H ₂ O a:	1000 ml.	500 ml
**Ampicilina (stock 100mg/ml)	1ml	0.5ml

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave
Guardar a temperatura ambiente.

- Medio LB 1X sólido / bacterias.

- A 1000 ml de LB 1X líquido agregar 15 g de agar.
- Colocar en cajas y guardar a 4 °C.

**Ampicilina (stock 100mg/ml) agregar 1ml

** El antibiótico es opcional y se agrega cuando el medio esta tibio.

- Gel Agarosa 1% para DNA

Agarosa	0.3 g
TBE 1X	30 ml
Bromuro de etidio	1.4 µl

Se funde la agarosa en el buffer TBE 1X, se agrega el bromuro de etidio.

Solidificado se coloca en cámara de electroforesis y se cargan las muestras de DNA con el colorante

Se corre el gel a 70 mV

- Buffer TBE

Stock	10X	5X	[] final 1X (sol de trabajo)
Tris base	108 g	54 g	89 mM
Acido bórico	55 g	27.5 g	89 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 ml	20 ml	2 mM
Aforar a:	1000 ml.	1000 ml	

- Colorante para corrimiento en gel (DNA).

Azul de bromofenol	0.25%
Xileno cianol FF	0.25%
Glicerol en agua	30%

Guardar a 4 °C.

- Agua DEPC 0.1%

1. Agregar 1 ml de reactivo DEPC (dietilpirocarbonato) a 1 litro de agua desionizada y destilada
2. Incubar toda la noche a 37 °C, con agitación
3. Esterilizar 30 min. en autoclave.
4. Hacer alícuotas y guardar a 4 °C o a -20 °C

NOTA: Todas las muestras de DNA y RNA se disuelven en esta agua, así como su manejo

- Gel Agarosa RNA

1. Disolver 0.3g de agarosa en 30 ml de H₂O.
2. Añadir 3 ml de MOPS 10X.
3. Añadir 1.5 ml de formaldehído.
4. Vaciar en la caja.

Nota: El formaldehído se tiene que añadir cuando el gel este a -50 °C

- Procesamiento y cargado de las muestras de RNA

- MOPS 10X Buffer de corrimiento.

	1000 ml	[] final
MOPS (libre de ácido)	41.86 g	0.4 M
Acetato de sodio	6.8 g	0.1 M
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml	0.01 M

Llevar a pH 8.0 con 6.8 ml de NaOH 10N. Filtrar y guardar a 4 °C tapado con aluminio.

- Buffer de Ligación

	Stock	10X	[] final 1X
Tris HCl pH 7.6	1 M	500 µl	50 mM
MgCl ₂	1 M	100 µl	10 mM
DIT	100 mM	100 µl	1 mM
H ₂ O		300 µl	1 mM ATP

Hacer alícuotas de 100 µl y guardar a -20 °C.

El ATP se agrega aparte, en la reacción de ligación.