

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Expresión de canales de cloro humanos activados por voltaje (hCIC) en una cepa mutante del gen *GEF1* de *Saccharomyces cerevisiae* 

# TESIS

## QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA FERNANDO ROSAS SÁNCHEZ

## DIRECTOR DE TESIS: DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

Querétaro, México. Noviembre de 2006

Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Neurobiología, Maestría en Ciencias (Neurobiología)



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. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Fernando Rosas Sánchez, cuyo título es: "Expresión de canales de cloro humanos activados por voltaje (hClC) en una cepa mutante del gen *GEF1* de *Saccharomyces cerevisiae*", se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

	Firma
Presidente	
Dr	
Secretario (Tutor)	
Dr	
Vocal	
Dr	
Suplente	
Dr	
Suplente	
Dr	

Aprobado por el Comité Académico

Dr.Rogelio Arellano Ostoa Coordinador de la Maestría

#### AGRADECIMIENTOS

A mis padres Amalia Alicia Sánchez Díaz y Armando Rosas Balbuena por la educación que me brindaron, por su apoyo, cariño y disciplina. Por darme la vida y mostrarme su camino.

A mis hermanos por sus ejemplos, desvelo y preocupación.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres por haberme aceptado en su laboratorio, por sus enseñanzas y amistad.

Al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez y Dr. Michael Conrad Jeziorski por el apoyo académico.

A la M. en C. Angélica María López Rodríguez por el apoyo académico y técnico durante todo el proyecto. Por su amistad y tiempo.

Al M. en C. Abraham Rosas Arellano por su amistad y apoyo incondicionales. Más aún por escucharme y orientarme.

A la Biol. Yoana Daniela Cano Sotomayor por apoyarme en los tiempos difíciles, por su amistad y cariño.

Laboratorio de Neurobiología Molecular II:

Dra. Carmen Mejía Vázquez, Dra. Irma Alicia Martínez Dávila, Dr. Lenin Ochoa de la Paz, M. en C. Gustavo Martínez Delgado, M. en C. Flor de María Trejo M, M. en C. Ariel López Chávez, M. en C. Argel Raúl Estrada Mondragón, Biol. Joel Vergara Quintanar, Quím. Carlos Martínez del Valle, Quím. Francisco Ernesto López Salas, D. G. Efrén Ruiz Alcibar, Berenice Salazar y Alejandra González por su amistad y tolerancia diaria.

Unidad de Biología Molecular:

Dra. Anaid Antaramian Salas

Biblioteca:

Bib. Rafael Silva Cruz

Unidad de Enseñanza: Quím. Leonor Casanova Rico

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Becario No. 189353

#### DEDICATORIA

A mi hijo Fernando, pues en él radica mi fortaleza,

esperanza, paciencia y fe.

A quien amo desde que era solo sustancia,

por quien daría mi vida una y otra vez

aún en mi perenne ausencia.

A mis padres y hermanos, quienes ruegan por mí. Cuya vida ha sido mermada a expensas de mi felicidad. Gracias por su apoyo, por su aliento, por los principios y necesidad de verme moralmente feliz.

A ti, por acercarte a mí, por estar conmigo aún cuando no te necesitaba y por no estar cuando las decisiones dependían de mí. A ti, pues me hiciste más fuerte a pesar del dolor.

## ÍNDICE

#### **INTRODUCCIÓN**

## ANTECEDENTES

GENERALIDADES

CANALES DE CI<sup>-</sup> ACTIVADOS POR VOLTAJE (CIC).

1. CIC-1, UN CANAL DE CI<sup>-</sup> ESPECÍFICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

2. CIC-2 ES UN CANAL QUE SE EXPRESA AMPLIAMENTE

3. EL CANAL DE Cl<sup>-</sup> EN S. cerevisiae (Gef1p)

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

## **OBJETIVO GENERAL**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

## MATERIAL Y MÉTODOS

AMPLIFICACIÓN DEL DNA QUE CODIFICA PARA hCIC-1 y hCIC-2.

- 1. MATERIAL BIOLÓGICO
- 2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

3. RETROTRANSCRIPCIÓN

4. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

CLONACIÓN DE hCIC-1 y hCIC-2 EN UN VECTOR TOPO DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS

1. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

2. CLONACIÓN DE AMPLICONES EN EL VECTOR *pYES2.1/V5-HIS-TOPO* EXPRESIÓN DE hCIC-1 y hCIC-2 EN *S. cerevisiae* 

1. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS LITIO-COMPETENTES

2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CLONADAS DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS hCIC-1 y hCIC-2

1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR LISIS CELULAR CON ESFERAS DE CRISTAL ÁCIDAS

2. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

(poliacrilamida-SDS)

3. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

DETERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE hCIC-1 y hCIC-2: RT-PCR

1. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAN PARA hCIC-1 Y hCIC-2

ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS LEVADURAS RECOMBINANTES

1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE O<sub>2</sub> DE LAS CEPAS RECOMBINANTES **RESULTADOS** 

EXTRACCIÓN DE RNA Y OBTENCIÓN DE DNAc DE hCIC-1 Y hCIC-2 SECUENCIACIÓN

CLONACIÓN DE hCIC-1 Y hCIC-2 EN EL VECTOR *pYES2.1-V5-His-TOPO* TRANSFORMACIÓN DE LAS CLONAS RGY 30 Y RGY 192 DE *S. cerevisiae* 1. REVERSIÓN DEL FENOTIPO PETITE DE LA CLONA *gef1*<sup>-</sup> CON LA EXPRESIÓN DE hCIC-1 Y hCIC-2 CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE O<sub>2</sub> DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS hCIC-1 y hCIC-2 DETERMINACIÓN DEL TRANSCRITO DE hCIC-1 y hCIC-2 DISCUSIÓN PERSPECTIVAS CONCLUSIONES BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICES

Palabras clave: Canales de cloro, CIC, hCIC, Saccharomyces cerevisiae, Gef1p.

#### RESUMEN

El cloruro (Cl<sup>-</sup>) es el anión extracelular más abundante y se encuentra involucrado en múltiples procesos biológicos, tales como el control del volumen celular, control de pH, balance electrolítico, secreción gástrica y otros procesos de secreción. Los movimientos de entrada y salida de Cl<sup>-</sup> a nivel celular juegan un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis para todo sistema vivo. Este movimiento de Cl<sup>-</sup> ocurre a través de la activación de mecanismos que involucran a los *canales de Cl<sup>-</sup> sensibles a volumen, cotransportadores para Cl<sup>-</sup> sensibles a volumen, y canales de Cl<sup>-</sup> regulados por voltaje todos ellos se agrupan dentro de la familia de canales "ClC".* 

En mamíferos se han encontrado nueve genes que codifican para proteínas CIC se conocen desde CIC-1 hasta CIC-7, CIC-Ka y CIC-Kb los que comparten una similitud de secuencias de aminoácidos de 30-80%. Los canales humanos hCIC-1 y hCIC-2 son activados por voltaje, y al igual que el CIC de *Saccharomyces cerevisiae* (Gef1p) poseen secuencias de aminoácidos altamente conservadas que participan en la formación del poro iónico. Mutaciones en Gef1p, producen levaduras con fenotipo *petite* el cual es revertido con la expresión de proteínas homólogas.

En este estudio valoramos la reversión del fenotipo *petite* de levaduras *gef1<sup>-</sup>* al expresar las proteínas hClC-1 o hClC-2. En ambos casos, la reversión de dicho fenotipo se determinó por aumento en el tamaño de las colonias, en el diámetro celular y en la recuperación del consumo de oxígeno, cuyos valores son equiparables a los observados en levaduras silvestres. Con estos resultados sugerimos que la levadura *S. cerevisiae* puede ser un buen modelo para el estudio de patologías relacionadas con mutaciones de las proteínas hClC-1 y hClC-2.

#### ABSTRACT

Chloride (Cl<sup>-</sup>) is the most abundant extracellular anion involved in multiple biological processes as the control of intracellular and corporal volume, gastric secretion, control of pH, electrolytic balance and another processes of secretion. The entrance and exit of Cl<sup>-</sup> to and from the cell play a fundamental role in the maintenance of the homeostasis for all live systems. This movement of Cl<sup>-</sup> happens through the activation of different mechanisms that include volume sensitive chloride channels, volume sensitive chloride cotransporters, and voltage-gate chloride channels all of them represented within the family of "CIC chloride channels".

In mammals nine genes that encode for homologous proteins have been identified. They are known from CIC-1 to CIC-7, CIC-Ka and CIC-Kb with a similarity in amino acid sequences of 30-80%. The human channels hCIC-1 and hCIC-2 are regulated by voltage and share with the CIC of *Saccharomyces cerevisiae* (Gef1p) highly conserved amino acid sequences that participate in the formation of the ionic pore. Mutations in *gef1* produce yeast with a *petite* phenotype which is reverted with the expression of homologous proteins.

In this study we evaluate the reversion of the petite phenotype of a yeast *gef1*<sup>-</sup> strain after expressing the hClC-1 or hClC-2. In both cases the reversion of this phenotype was determined by the increase in size of the colonies, increase in the cellular diameter and the recovery of the oxygen consumption, whose values are similar to the wild type yeast. With these results we suggested that *S. cerevisiae* may be a good model for the study of pathologies related to mutations of proteins hClC-1 and hClC-2.

#### INTRODUCCIÓN

Las membranas celulares son cruciales para la vida de organismos unicelulares y pluricelulares. La membrana plasmática delimita a la célula y mantiene las diferencias entre el contenido dentro de la misma y su entorno. En células eucariotas, las membranas de mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y otros organelos, mantienen las diferencias entre el contenido de cada organelo y el citosol (Lodish *et al.*, 2002). Todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común que consta de una fina capa de moléculas lipídicas y proteicas, las cuales se mantienen unidas mediante uniones no covalentes. Son estructuras dinámicas, fluidas y la mayoría de sus moléculas son capaces de desplazarse en el plano membranal. Las moléculas lipídicas se encuentran dispuestas en forma de una doble capa continua de aproximadamente 5 nm de grosor: la *bicapa lipídica*. Esta última constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de las moléculas hidrosolubles (Alberts *et al.*, 2004).

Las moléculas proteicas embebidas en la bicapa lipídica son las responsables de la mayoría de las funciones de membrana, tales como el transporte de partículas a través de dicha bicapa, o catalizando reacciones asociadas a membrana, como la síntesis de ATP. Otras proteínas actúan como receptores que reciben y transducen las señales químicas procedentes del entorno celular (Alberts *et al.*, 2004). En la membrana plasmática, algunas proteínas actúan como eslabones estructurales que conectan a estructuras del citoesqueleto con la matriz extracelular o con una célula adyacente. Así pues, lípidos y proteínas son los principales constituyentes de la bicapa lipídica (Lodish *et al.*, 2002).

Debido a su interior hidrofóbico, la bicapa lipídica celular constituye una barrera altamente impermeable a la mayoría de las moléculas polares. Esta función de barrera es de vital importancia ya que permite mantener concentraciones diferentes de solutos en los compartimentos intra y extracelular, y entre el citosol y organelos celulares limitados por membrana. Por ende, también existe una diferencia en potenciales eléctricos entre el citoplasma y el medio extracelular. Para poder utilizar

esta barrera, las células han desarrollado sistemas para transportar de forma específica moléculas hidrosolubles a través de sus membranas y así poder incorporar los nutrientes esenciales, excretar los productos residuales de su metabolismo y regular las concentraciones iónicas intracelulares (Alberts *et al.*, 2004).

Uno de estos sistemas son los *canales iónicos*, conceptualizados como poros proteicos embebidos dentro de las membranas biológicas que permiten la difusión pasiva de iones a través de las mismas por un proceso altamente sofisticado (Aidley y Stanfield, 1996). Estos canales pueden ser selectivos para uno o varios tipos de especies iónicas, mantienen una alta velocidad de transporte (hasta 100 millones de iones por segundo) y al mismo tiempo el flujo iónico es regulado por la activación o inactivación del canal, proceso llamado 'gating' (Kandel *et al.*, 2001).

Los canales iónicos han sido estudiados y clasificados en base a su activación, así se conocen los canales activados por ligando (intracelular o extracelular), los activados por voltaje, los activados mecánicamente, y aquellos activados por temperatura. Adicionalmente, estos canales pueden ser regulados por calcio, fosforilación, variaciones en el pH o temperatura, y lípidos. La mayoría de los canales son oligómeros constituidos por subunidades B formadoras del poro, que pueden ser idénticas u homologas (Lodish *et al.*, 2002 Chen, 2005).

Las proteínas que actúan como canales iónicos *activados por voltaje* poseen tres características, que permiten a la célula nerviosa conducir impulsos eléctricos: a) la apertura en respuesta a variaciones en el potencial de membrana, b) el consecuente cierre de los canales y su inactivación, y c) su alta especificidad de permeabilidad para ciertos iones y de impermeabilidad para otros, es decir, *selectividad iónica* (Lodish *et al.*, 2002)

Una de las formas por las cuales el cloruro (Cl<sup>-</sup>) se mueve a través de los compartimentos celulares es por la función de canales iónicos selectivos para este ión, que pueden o no ser activados por voltaje (ClC) (Maduke *et al.*, 2000). En humanos existen nueve genes que codifican para canales de este tipo (Chen, 2005). Mutaciones a lo largo de la secuencia que codifica para algunas de estas proteínas

origina patologías en seres humanos, como miotonía autosómico dominante (Thomsen, 1876) o autosómico recesiva ( ecker, 1957), epilepsia (Haug *et al.*, 2003), enfermedad de Dent (Lloyd *et al.*, 1996), síndrome de artter y osteopetrosis (Jentsch et al., 2002).

Aún existen muchos aspectos por aclarar sobre la biología molecular de los CIC, es así que la creación de modelos experimentales para su entendimiento es imperante. Más aún, los efectos de su aplicación en el estudio de patologías relacionadas con mutaciones de estas proteínas, nos proporcionaría una gran herramienta terapéutica para combatirlas.

Como se menciono arriba, el transporte de partículas cargadas hacia uno u otro lado de la membrana por medio de los canales iónicos, es una función básica que se ha conservado en la evolución, desde procariotes como *Escherichia coli* (Saimi *et al.*, 1988), organismos eucariotes unicelulares como el *Paramecium* y *Saccharomyces cerevisiae*, hasta eucariotes multicelulares como plantas y mamíferos (Wolfe, 2006).

La levadura gemante *S. cerevisiae* puede ser utilizada como un excelente sistema para el estudio de proteínas asociadas con canalopatías, esto gracias a que se ha logrado secuenciar y anotar su genoma completo (Goffeau *et al.*, 1996), su manipulación genética es fácil, se reproduce en cortos periodos de tiempo, y además de ser un organismo eucariote posee homólogos con la mayoría de los tipos de canales iónicos. Aunado a esto, la deleción de genes que codifican para dichos canales iónicos en la levadura, resulta en un cambio fenotípico fácilmente observable (Wolfe y Pearce, 2006).

#### ANTECEDENTES

#### GENERALIDADES.

Hodgkin y Huxley en 1952, dentro del análisis de la actividad eléctrica del axón gigante de calamar, establecieron que tanto sodio (Na<sup>+</sup>) como potasio (K<sup>+</sup>) contribuyen en la corriente iónica, con un flujo opuesto de los mismos. La despolarización produce un incremento rápido y transitorio en la conductancia de Na<sup>+</sup>, y un incremento lento y sostenido en la conductancia de K<sup>+</sup>; estos cambios los describieron en una ecuación (la cual hace alusión a sus nombres) basada en la existencia de sitios particulares para flujo iónico que se abren como respuesta a cambios en el potencial de membrana y a la composición electrolítica a ambos lados de la bicapa lipídica. Estos sitios ahora son llamados canales dependientes de voltaje para sodio y potasio (Aidley y Stanfield, 1996; Corry y Cheng, 2006).

Hodgkin y Richard en 1955, investigaron la permeabilidad de potasio a nivel axonal. Encontraron que el movimiento de iones potasio, marcados radioactivamente, a través de la membrana axonal se explicaba mejor si estos pasaban por un poro estrecho y ordenados en fila, usaron la palabra *canal* para describir su paradigma.

Hacia 1960 se descubrieron agentes específicos bloqueadores de canales, uno de estos fue la tetradotoxina (TTX) aislada del pez fugu cuya acción es bloquear canales de sodio voltaje-dependientes. El uso de TTX en experimentos electrofisiológicos del axón nervioso permitió el estudio específico de canales de potasio; mostrando de forma convincente que los canales de sodio y potasio actúan como entidades separadas (Aidley y Stanfield, 1996).

Doley *et al.* (1998) definieron la estructura a alta resolución de un canal iónico bacteriano para potasio (KcsA), además de sugerir dos probables mecanismos para la conducción y selectividad iónica. Este hallazgo representa el pilar de la gran familia de canales catiónicos y de los consecuentes estudios en cuanto a función y estructura de los mismos.

La mayor atención se ha dirigido hacia los canales catiónicos, probablemente por el papel que juegan en la generación de señales eléctricas en las células del sistema nervioso, y por ser el primer canal cristalizado y definido estructuralmente. En general, los canales iónicos poseen tres propiedades importantes:

1. Conducen iones con un flujo alto. En nervio y músculo estos canales conducen iones a través de la membrana celular a velocidades extremadamente altas, alrededor de 100 millones de iones por segundo. Este flujo iónico es el causante de las variaciones del potencial de membrana necesarias para la transmisión de señales (Kandel *et al.*, 2001; Jordan, 2005).

2. Selectividad iónica. La cual se refiere a la habilidad de los canales para seleccionar una especie iónica del ambiente celular (interno o externo), y que cataliza su flujo a través del poro iónico (Dutzler *et al.*, 2003; 2004; Gouaux y MacKinnon, 2005; Lobet y Dutzler, 2006).

3. Se abren o cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas. Dicho proceso incluye la apertura y cierre del poro iónico por medio del cual la conducción de iones es encendida o apagada, a este proceso se le llama *gating* (Dutzler *et al.*, 2003; 2004; Gouaux y MacKinnon, 2005; Lobet y Dutzler, 2006).

Los canales iónicos se clasifican en dos grandes grupos: a) regulados y b) no regulados. Dentro de los primeros encontramos los *canales regulados por voltaje* (*voltage-gated channels*) que responden a variaciones del voltaje, los *canales regulados por ligando (ligand-gated channels*) que responden a transmisores químicos, y los *regulados mecánicamente (mecanically-gated)* que lo hacen en respuesta a la presión o estiramiento. Los segundos son canales que están normalmente abiertos (*canales en reposo*) y contribuyen a generar el potencial de reposo celular, tal como sucede con los canales en reposo selectivos a potasio (K<sup>+</sup>) en células gliales (Kandel *et al.*, 2001).

El primer canal iónico dependiente de voltaje que fue aislado y purificado, se obtuvo de la electroplaca de la anguila *Electrophorus electricus*, donde las concentraciones

de canales de Na<sup>+</sup> son muy elevadas, y en años siguientes se pudo deducir la secuencia de nucleótidos de este canal a partir de su DNAc (Noda *et al.*, 1984). Por otro lado, a partir de la mutante *shaker de Drosophila melanogaster*, se aisló la secuencia del primer canal de K<sup>+</sup> (Papazian *et al.*, 1987). De aquí en adelante se obtuvieron otras secuencias de canales de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en diferentes especies (Aidley y Stanfield, 1996).

Dichas secuencias presentan un patrón estructural básico, determinado por ensayos de hidrofobicidad: los canales funcionales se conforman por cuatro subunidades (canales de  $K^+$ ) o por una sola proteína con cuatro dominios homólogos (canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup>). Cada uno de los dominios o subunidades posee seis dominios transmembranales y un asa formadora de poro (figura 1). El quinto y sexto segmento transmembranal (S5 y S6) y el asa formadora de poro son los responsables de la conducción iónica. El cuarto dominio transmembranal (S4), contiene un gran número de residuos de argininas y lisinas y ha sido postulado como el sensor de voltaje de dichos canales (Bezanilla, 2005).

Los canales voltaje-dependientes están constituidos por tres porciones básicas: un sensor de voltaje, un poro o vía de conducción y una compuerta o "gate" (Bezanilla, 2005; Jordan, 2005).



Figura 1. Arquitectura general de un canal dependiente de voltaje. A la izquierda se observa la estructura primaria (una subunidad o dominio) y sus seis dominios transmembranales; el poro iónico y la compuerta se encuentran en los dominios S4-asa-S5, y el sensor de voltaje en la región S1-S4. Los signos + y – indican cargas implicadas en el censor de voltaje. A la derecha se ilustra un canal iónico voltaje-dependiente funcional.

Por otro lado, existen canales iónicos que permiten el flujo de partículas con cargas negativas, tal es el caso de la especie iónica Cl<sup>-</sup>.

El Cl<sup>-</sup> es el anión extracelular más abundante y se encuentra involucrado en múltiples procesos biológicos, incluidos el control del volumen intracelular y corporal, control de pH, balance electrolítico, secreción gástrica, y una gran cantidad de procesos de secreción (Kirk, 1991a, b). La habilidad para regular el volumen celular es uno de los más antiguos y esenciales procesos de homeostasis para todos los sistemas vivos, aquí los movimientos de entrada y salida de Cl<sup>-</sup> juegan un papel primordial en el mantenimiento de dichas respuestas de adaptación (Valverde *et al.*, 2004). La entrada o la salida de Cl<sup>-</sup> a nivel celular, ocurre a través de la activación de diferentes mecanismos que incluyen canales de Cl<sup>-</sup> sensibles a volumen, cotransportadores para Cl<sup>-</sup> sensibles a volumen, y canales de Cl<sup>-</sup> regulados por voltaje (Sardini *et al.*, 2003).

En particular, los *canales aniónicos* permiten la difusión pasiva de iones con carga negativa a través de un gradiente electroquímico y su selectividad se extiende a otros iones. Aún cuando estos canales pueden conducir otros aniones como bromo (Br<sup>-</sup>), yodo (l<sup>-</sup>) y trioxido de nitrógeno (NO<sup>-</sup><sub>3</sub>), aún mejor que cloruro (Cl<sup>-</sup>), estos son llamados *canales de cloruro* (ClC) debido a que el anión Cl<sup>-</sup> es el más abundante en el organismo y a que es el ión predominantemente permeable en la mayoría de los eventos en los que los ClC se ven involucrados (Nilius y Droogmans, 2003). Por otra parte, el costo energético para el transporte de Cl<sup>-</sup> es muy bajo puesto que el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> es cercano al potencial de reposo de la mayoría de las células (Nilius y Droogsman, 2003).

Hoy se sabe que el proceso de apertura y cierre de los CIC puede depender del voltaje transmembranal (los *canales dependientes de voltaje*), del aumento del volumen celular, de la unión de moléculas de señalización (*canales dependientes de ligando* en membranas postsinápticas), de iones (aniones, H<sup>-</sup>, o Ca<sup>2+</sup>), de la fosforilación de residuos intracelulares por diferentes proteínas cinasas, o por la unión u hidrólisis de ATP (Jentsch *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004).

Miller y White (1980; 1984) mostraron la existencia y describieron las características biofísicas de un tipo particular de canales de Cl<sup>-</sup> en el órgano eléctrico de la raya *Torpedo californica*. Estos canales fueron estudiados in extenso a través de su

reconstitución en bicapas lipídicas. Sugirieron su función en base a un complejo de dos protocanales idénticos (*estructura dimérica*), cada uno con un proceso de apertura y cierre independientes, en una escala de tiempo de milisegundos. Su proceso de apertura rápida y un cierre lento se atribuyó a la influencia del voltaje y del pH extracelular. Hasta hoy no se sabe cual de las estructuras que conforman el canal es el sensor de voltaje, tal parece que el "gating" es modulado por la concentración extracelular de aniones y pH, como propuso Miller y White en primera instancia (Rychkov *et al.*, 1998; Jentsch *et al.*, 2002).

Esto dio la pauta para que Jentsch *et al.* (1990) identificaran y clonaran el primer canal de CIC activado por voltaje (CIC-0), a partir del órgano eléctrico de la raya *Torpedo marmorata*. Su secuencia consta de 805 aminoácidos, y revela una proteína con un peso aproximado de 89 kDa, con un centro hidrofóbico largo que atraviesa la membrana plasmática en por lo menos 10 ocasiones, y una cola citoplasmática extensa. Dicha proteína no presenta homología significativa con los otros canales iónicos conocidos (Pusch y Jentsch, 2005).

De forma subsiguiente a la clonación de CIC-0, el grupo de O´Neal (1991) clonó el CIC de la raya *Torpedo californica*, presentando una identidad en su secuencia de nucleótidos del 97% en comparación con CIC de la raya *Torpedo marmorata*. La diferencia eran 24 aminoácidos, de los cuales solo uno se presenta en el segundo dominio transmembranal, lugar donde se encuentran motivos, que ahora se sabe están relacionados con el proceso de "gating" (Guggino, 1994).

Con esto se establecen las bases para el posterior descubrimiento de la familia de canales de CIC activados por voltaje (CIC), homólogos a CIC-0. Los genes que codifican para los CIC se encuentran en todos los organismos en los que se han buscado, desde humanos e invertebrados, hasta plantas (*At-CIC*), protistas y procariotas (*ec1-CIC*) (figura 1). En mamíferos se han encontrado nueve genes que codifican para proteínas homólogas a CIC-0. Se conocen desde CIC-1 hasta CIC-7, CIC-Ka y CIC-Kb (figura 2), estos poseen una similitud entre secuencias de aminoácidos de 30-80% (Maduke *et* al., 2000; Jentsch et al., 2002; Chen, 2005).

Al comparar las secuencias de aminoácidos y tomar en cuenta sus propiedades funcionales, se les clasificó en tres subfamilias (Maduke *et al.*, 2000; Jentsch *et al.*,

1999). CIC-0 y sus homólogos en mamíferos (CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y CIC-Kb), comparten sus secuencias con una similitud aproximada de 50 a 60 % entre cada una. Estas proteínas se encuentran en membrana plasmática controlando el flujo de CI<sup>-</sup> y el potencial de membrana. La segunda rama de la familia incluye CIC-3, CIC-4 y CIC-5. Dichas proteínas se localizaron en membranas de vesículas y organelos intracelulares y se les atribuye la función de control de pH de las mismas (Stobrawa *et al.*, 2001). La tercera rama de la familia comprende CIC-6 y CIC-7 (figura 2), que se expresan de forma amplia en varios tejidos, sin embargo la expresión heteróloga de éstos en ovocitos de *X. laevis* no genera un canal funcional; por ende se ha propuesto la teoría de que estos canales no son funcionales en membrana plasmática y que son exclusivos de organelos, en forma particular de endosomas y lisosmas (Kida *et al.*, 2001). Los CIC desempeñan un papel importante en la regulación de la excitabilidad celular, en el transporte transepitelial, en la regulación del volumen celular, y en la acidificación de organelos celulares (Jentsh *et al.*, 1999).



Figura 2. Familia de canales de cloruro (CIC). Se observan los tres grandes grupos o subfamilias ya descritos. En negritas se indican las proteínas de mamíferos. Mutaciones en cada uno de los CIC de humano se relacionan con patologías específicas.

Se ha comprobado que la activación es dependiente de voltaje únicamente en CIC-1 y CIC-2 a semejanza de CIC-0 (Chen, 1998). Ambos, poseen una alta homología con CIC-0, 54% y 49% respectivamente (Steinmeyer *et al.*, 1991; Thiemann *et al.*,

1992). Entre CIC-1 y CIC-2 existe una identidad del 55% (Thiemann *et al.*, 1992); estudios sobre estas dos proteínas por Lorenz *et al.* (1996), sugieren la formación de heterodímeros funcionales, empero con alteraciones en sus propiedades, a partir de mezclas de los mismos.

Maduke *et al.* (1999) establecen el punto de partida hacia el descubrimiento de la conformación estructural de los canales de cloruro con la identificación de proteínas homólogas a CIC-0 en *Escherichia coli* (ec1-CIC) y *Salmonela Thyphimurium* (StCIC). La caracterización estructural de dichas proteínas la realizan Mindell *et al.* (2001) mediante una combinación de técnicas de microscopía electrónica, cristalografía y difracción de rayos-X, obteniendo imágenes a una resolución de 3.5 Å y 3.0 Å (Dutzler *et al.*, 2002).

La proteína ec1-CIC está conformada por dos subunidades idénticas (homodímeros), cada una con estructura triangular en una vista desde la cara externa de la membrana celular (figura 3: a y b). Cada subunidad se encuentra formada por 18 hélices  $\alpha$ , nombradas de A-R a partir del extremo amino terminal hacia el extremo carboxilo de la proteína, algunas de las cuales no cruzan por completo la membrana. Estas poseen una topología compleja con arquitectura antiparalela y una orientación opuesta (figura 3, c y d). De forma inicial, a través de estudios de hidropatía se sugirieron 13 segmentos hidrofóbicos con capacidad de cruzar la membrana, estos fueron llamados D1 a D13 (Jentsch *et al.*, 1990).

Tanto el extremo amino como el carboxilo terminal residen en el citoplasma, esto fue propuesto por Gründer *et* al. (1992) con estudios por mutagénesis sitio-dirigida de la proteína hCIC-2. También se sabe que los dos dominios CBS (cystathionine- $\beta$ -synthase) presentes en el extremo carboxilo terminal de todas las proteínas CIC de eucariotes (Ponting, 1997; Jentsch *et al.*, 2002; Hebeisen *et al.*, 2004) participan en la conformación estructural de cada subunidad de los CIC, a partir de la formación de dímeros (Meyer y Dutzler, 2006).

Aquellos CIC que han sido estudiados a nivel de canal único (CIC-0, CIC-1 y CIC-2), exhiben dos niveles de conductancias iguales que se acoplan a la teoría de poros idénticos. Una subunidad por si misma forma un poro estructural y funcional, cuya

selectividad iónica es propiedad del arreglo de hélices-<u>α</u> y las interacciones químicas con átomos de nitrógeno y grupos hidroxilo, tal como se confirmara en investigaciones previas (Middleton *et al.*, 1996; Ludewing *et al.*, 1996; 1997; Dutzler *et al.*, 2002; 2003).



Figura 3. Estructura del canal de *E. coli*. (a) Imagen bidimensional por crio-microscopía electrónica (tomado de Mindell et al., 2001). (b) Representación de la estructura del dímero ec1-CIC visto desde el lado extracelular. Se observan las dos subunidades, cada una con forma triangular en cuyo centro presenta una esfera que simula el CI<sup>-</sup> unido al sitio de selectividad del poro (tomado de Dutzler R, 2004). (c) Modelo topológico de la subunidad ec1-CIC. Las 18 hélices tipo  $\alpha$  están representadas por cilindros. El alineamiento de secuencias en la parte superior de la figura indica los aminoácidos conservados, que participan en la formación del canal iónico, entre ec1-CIC, CIC-0 de *Torpedo marmorata*, hCIC-1 humano, y tanto CIC-2 como CIC-1 de rata (tomado de Dutzler R, 2004). (d) Dominios transmembranales propuestos de CIC-0 por Schmidt RT y Jentsch TJ (1997).

El análisis estructural de ec1-CIC por medio de cristalografía, mostró que varias regiones de la proteína se encuentran agrupadas para formar el poro, y como se mencionó arriba, son cuatro hélices ubicadas en el plano central de la membrana

que se extienden desde dentro hacia fuera y en sentido antiparalelo (Dutzler *et al.* 2002).

El ión Cl<sup>-</sup> es coordinado por residuos de aminoácidos altamente conservados, ubicados a los extremos de dichas hélices; estos incluyen las secuencias *GSGIP* (al inicio de la hélice D o en el extremo de D2), *GK/REGP* (entre las hélices E-F o D3-D4), *GXFXP* (entre las hélices M-N o D9-D10), y adicionalmente Y (al inicio de la hélice R o al final de D12) (figura 3 c-d). Dichas regiones siempre presentan su extremo amino terminal orientado hacia el sitio de unión del ión Cl<sup>-</sup>. Amen de la propiedad de dipolo de cada hélice, o a la carga positiva de su extremo amino terminal, el arreglo estructural crea un ambiente electrostático favorable para la unión del anión y su flujo a través del poro (Dutzler *et al.*, 2002; 2003).

Como se mencionó anteriormente, mutaciones en los genes que codifican para canales CIC se traducen en enfermedades. La Miotonía (enfermedad de Becker o enfermedad de Thomsen), se explica por mutaciones puntuales del CIC-1 que inducen inestabilidad del potencial de membrana que produce disparos de potenciales de acción (Koch et al., 1992). La enfermedad de Dent ligada al cromosoma X, se relaciona con mutaciones en el gen CLC-5 y se asocia a proteinuria de bajo peso molecular, hipercalciuria, hiperfosfaturia, litos renales, nefrocalcinosis y rickets; todo ello a cusa de un defecto en la acidificación endosomal (Lloyd et al., 1996). El síndrome de Bartter (CIC-Kb) se caracteriza por perdida renal de sodio, hipotensión, alcalosis hipocalcemica e hipercaciuria; aquí existe un defecto en la reabsorción de electrolítos que se acompaña con un decremento en la conductancia de Cl<sup>-</sup> en la porción basolateral del epitelio renal que causa una inhibición funcional del cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (NKCC2) en la porción apical (Simon et al., 1997). Alteraciones en CLC-2 producen degeneración testicular y de retina (Blös et al., 2001); su relación con Epilepsia idiopática también es clara (Huang et al., 2003). La Osteopetrosis se relaciona a mutaciones en CLC-7, esta enfermedad se caracteriza por presentar deformaciones óseas secundarias a la disposición anormal de trabéculas óseas, eritropoyesis extra-medular y falla en la dentición (Kornak et al., 2001).

#### CANALES DE CI<sup>-</sup> ACTIVADOS POR VOLTAJE (CIC).

#### 1. CIC-1, UN CANAL DE CI<sup>-</sup> ESPECÍFICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.

La conductancia membranal en músculo esquelético está dada por el transporte de iones Cl<sup>-</sup> en un 70 a 85%, esto es esencial para la estabilidad de su potencial de membrana. La clonación de ClC-1 fue hecha por Steinmeyer *et al.* (1991) a partir de músculo esquelético de rata y basado en la homología del ClC-0 de la raya *Torpedo marmorata*. El gen que codifica para esta proteína de 944 aminoácidos se localiza en el cromosoma 7 de la rata, y posee una homología del 54% con respecto a la proteína ClC-0. Este mismo DNAc fue clonado de humano por Koch *et al.* (1992). El gen CLCN1 se encuentra en el cromosoma 7 humano, y codifica para un cDNA de 2967 pb.

Análisis por Northern blot indican que CIC-1 se expresa de forma exclusiva en músculo esquelético o estriado; se sabe también que la transcripción de CIC-1 aumenta a partir del nacimiento y hasta el día postnatal 30 en el músculo estriado de rata (Steinmeyer *et al.*, 1991). Aunado a ello la conductancia para Cl<sup>-</sup> aumenta a partir del nacimiento, sugiriendo que tanto ésta como la expresión de CIC-1 dependen de la actividad eléctrica muscular (Conte *et al.*, 1989; Klocke *et al.*, 1994). Por otro lado, Gurnett *et al.* 1995) basado en estudios de inmunocitoquímica sugiere que CIC-1 se expresa de forma preferente en la membrana del sarcolema de músculo esquelético.

La proteína CIC-1, al ser expresada en ovocitos de *X. laevis* tiene una fase de activación rápida (fase gate) posterior a despolarización y despliega una corriente de rectificación entrante a potenciales positivos (Steinmeyer *et al.*, 1991). La hiperpolarización produce una apertura lenta (slow gate), mientras que el cierre de esta apertura lenta a potenciales positivos desactiva la corriente (Chen, 1998).

Existen patologías relacionadas con mutaciones en el gen que codifica para hClC-1. Una de ellas, la miotonía generalizada autosómico recesiva (MG) o enfermedad de Becker (Becker, 1957), tiene una incidencia de 1: 23000. En comparación con la MG, la miotonía congénita autosómico dominante (MC) o enfermedad de Thomsen (Thomsen, 1876), tiene una incidencia mayor (1: 50000) (Lehmann y Jurkat, 1999).

En la MC, la proteína mutada puede estar asociada con una subunidad silvestre (sin mutación) para formar un canal dimérico en el cual se altera la dependencia de voltaje (Pusch y Jentsch, 2005). Clínicamente esta forma dominante de miotonía es menos severa que la recesiva, puesto que el 25% de los canales se conforman por subunidades nativas en pacientes heterocigotos.

Lo que caracteriza a estas patologías es la presencia de rigidez muscular (agotamiento) que inicia en edades tempranas de la infancia; tal rigidez es temporal y se prolonga cuando la actividad muscular se inicia después de largos periodos de reposo (Koch *et* al., 1992). Esto es resultado de la hiperexcitabilidad de la membrana muscular a consecuencia de la pérdida de la corriente de repolarización a través del CIC-1. De tal forma que un estímulo que normalmente se obtiene con un potencial de acción, desencadena un tren de potenciales de acción, trayendo como resultado una relajación muscular deficiente (Koch *et al.*, 1992; Nilius y Droogmans, 2003).

Por otro lado, teóricamente el tratamiento puede ser posible si la función se encuentra parcialmente reducida como en el caso del tipo dominante o en aquellas mutaciones que presentan una función residual. Un ejemplo de lo último es la mutación M485V, donde se observa una reducción de la conductancia a nivel de canal único (Wollnik et al., 1997). Un fármaco que sea capaz de incrementar la probabilidad de apertura del canal, podría aumentar la coductancia de Cl<sup>-</sup> en músculo esquelético y con ello abatir la hiperexitabilidad. Hasta el momento solo se sabe de dos agentes farmacológicos que tienen una alta interacción con CIC-1: el ácido carboxílico 9-antraceno (9AC) y el ácido p-cloro-fenoxi-propionico (CPP); sin embargo tanto 9AC como CPP, inhiben la conductancia de Cl<sup>-</sup> en el ClC-1 de músculo esquelético con una afinidad de 10-50 mM. Luego entonces estos fármacos son bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> y por ende reducen la probabilidad de apertura del canal, manteniéndolo en un estado cerrado (Pusch, 2002). El tratamiento ideal consistiría en incrementar, de forma específica o no, la conductancia de Cl<sup>-</sup> en músculo esquelético y hasta el momento no se cuenta con un fármaco que posea estas bondades.

#### 2. CIC-2 ES UN CANAL QUE SE EXPRESA AMPLIAMENTE.

El DNAc que codifica para la proteína CIC-2 fue clonado por Thiemann *et al.* (1992), y una vez más por comparación con la secuencia de CIC-0. Ensayos de Northern blot muestran la expresión de CIC-2 de forma amplia más no ubicua; siendo el cerebro, riñón e intestino los sitios relativos de mayor expresión (Thiemann *et al.*, 1992). Esta proteína puede ser activada por hiperpolarización, aumento del volumen celular (Gründer *et a.*, 1992) y por acidosis extracelular, es decir, por valores de pH bajos (Jordt *et al.*, 1997). Su selectividad iónica es compartida tanto con CIC-1 como con CIC-0, es decir, que en forma preferente difunden CI<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>I<sup>-</sup> (Thiemann *et al.*, 1992; Nilius y Droogmans, 2003). En humano, el gen CLCN2 se encuentra en el cromosoma 3, y codifica para un cDNA de 2697 pb. La clonación de hCIC-2 fue reportada por Thiemann *et al.* (1992).

A nivel encefálico, se ha demostrado una elevada expresión de CIC-2 en células piramidales de hipocampo, en células de Purkinje de cerebelo y de forma menos abundante en otros tipos celulares y neuroglia (Skin *et al.* 2000). A nivel epitelial, CIC-2 se ha encontrado en uniones estrechas de células apicales, y en lóbulos apicales de pulmón. Se le ha atribuido una gran relevancia a la expresión de CIC-2 durante el desarrollo de la rata a nivel renal y pulmonar, pues probablemente participa en la maduración de los mismos. Otros tejidos involucrados en la expresión de esta proteína son la retina y el epitelio pigmentario de la misma (Jentsch *et al.*, 1999; 2002; Nilius y Droogmans, 2003; Chen, 2005). Cabe señalar que todos los estudios anteriores fueron hechos en rata y/o ratón.

La proteína CIC-2 probablemente juega un papel importante en la regulación de la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> en neuronas y por ende es esencial para la nuerotransmisión inhibitoria; ello se sustenta en ensayos con ratones en los que la deleción del gen que codifica para dicha proteína genera epilepsia (Thiemann *et al.*, 1992; Blös *et al.*, 2001). Cepas de ratones knockout para la proteína CIC-2, presentan degeneración testicular y retiniana atribuida a defectos en el transporte transepitelial en células de Sertoli y en el epitelio pigmentario de retina

respectivamente (Blös *et al.*, 2001). En humanos, mutaciones en CIC-2 han sido asociadas con epilepsia en algunas familias, dicha mutación causa perdida de la función normal de CIC-2, y deterioro en el flujo de salida de Cl<sup>-</sup>; lo que trae como consecuencia la acumulación del anión al interior celular, la disminución del gradiente transmembranal de Cl<sup>-</sup>, y la reducción en la respuesta inhibitoria mediada por GABA (Scheffer y Berkovic, 2003; Haug *et al.* 2003).

#### 3. EL CANAL DE Cl<sup>-</sup> EN S. cerevisiae (Gef1p).

La extraordinaria conservación del material genético, y probablemente de los procesos bioquímicos esenciales, entre organismos eucariotes es uno de los mayores hallazgos resultantes de la secuenciación del genoma (Wolfe y Pearce., 2006). Dicha conservación del genoma de la levadura gemante (*S. cerevisiae*), hace de esta un excelente sistema para el estudio de genes involucrados en el transporte del Cl<sup>-</sup> y en el metabolismo del hierro, entre otros. El genoma de la levadura consiste en 6043 genes, los cuales se han secuenciado por completo (Goffeau *et al.*, 1996).

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo capaz de satisfacer sus requerimientos de energía a partir del ATP obtenido del proceso de fermentación (Sherman, 1962). En la mayoría de los cultivos de levadura, existe al menos, el uno por ciento de células con alteración en su metabolismo respiratorio "vegetativas petites", donde una de las características de dicha alteración es la inhabilidad para utilizar fuentes de carbono no fermentables, como glicerol, lactato, acetato y etanol, y que en un cultivo se expresa como colonias reducidas en tamaño (pequeñas). Aunado a ello, existen levaduras fenotípicamente similares que resultan de la mutación de un solo gen (Sherman, 1962). Ahora se sabe que estas mutaciones están limitadas a la expresión génica y que su crecimiento es limitado por la inhabilidad para utilizar fuentes de carbono no fermentables (Tzagoloff y Dieckmann, 1990).

Huang *et al.* (1994), identificaron un marco de lectura abierto en el cromosoma X de *S. cerevisiae* cuya secuencia de aminoácidos es similar a la familia de canales de Cl<sup>-</sup> dependientes de voltaje. A este gen se le llamó *y*ClC-1. Un año antes, Greene *et al.* (1993), identificaron uno de los genes causales del fenotipo *petite* de *S. cerevisiae*,

el gen *GEF1*. Este gen codifica para Gef1p que corresponde al *y*ClC-1, el cual al ser mutado produce el fenotipo *petite* (levaduras pequeñas) en condiciones de crecimiento sujetas a bajas concentraciones de hierro. Este fenotipo mutante *gef1*<sup>-</sup>, es indicativo de un defecto en la respiración mitocondrial que interfiere con el metabolismo del hierro y genera levaduras *petite* como resultado del almacenamiento de este ultimo junto con enzimas mitocondriales. Aunado a ello, células intactas *gef1*<sup>-</sup> presentan un rango de consumo de oxígeno menor en comparación con células silvestres (Greene *et al.*, 1993).

El fenotipo *petite* de las levaduras mutantes *gef1<sup>-</sup>* puede revertirse con la expresión de la proteína que codifica para un canal de Cl<sup>-</sup> de la planta *Arabidopsis thaliana*; así lo comprobó Hechenberger *et* al. (1996) y Gaxiola *et al.* (1998). En estos experimentos las mutantes *gef1<sup>-</sup>* muestran una alta sensibilidad a sales como NaCl, cloruro de tetrametilamonio y MnCl<sub>2</sub>, la cual se suprime al expresar AtClC-c y AtClC-d; de igual forma se reportó la supresión del fenotipo petite inducido por pH (pH= 7). En otras condiciones, el defecto de crecimiento de las células *gef1<sup>-</sup>*, a un pH 7.0 y altas concentraciones de NaCl o Mn<sup>2+</sup> fue suprimido con la expresión de ClC-0, el primer ClC dependiente de voltaje (Gaxiola *et al.*, 1998).

Por otro lado, los dos miembros de la familia CIC de la tilapia *Oreochromys mossambicus* (OmCIC-3 y OmCIC-5) poseen una homología de 90.5% y de 79.2% con respecto a CIC-3 y CIC-5 de rata, respectivamente. Tanto OmCIC-3 como OmCIC-5 revierten el fenotipo *gef1*<sup>-</sup>; además se sugiere una función intracelular de los mismos (Miyazaki *et al.*, 1999).

La expresión de CIC-6 de ratón, en levaduras mutantes de *gef1<sup>-</sup>* también revierte el fenotipo clásico de esta mutación, lo que no sucede con CIC-7; tanto CIC-6 como CIC-7 son funcionales al ser expresados en ovocitos de *X. laevis* (Kida *et al.*, 2001). Todo esto sugiere que el CIC de esta levadura funciona como un canal de CI<sup>-</sup> (Schmidt y Jentsch, 1997). Sin embargo, ningún estudio ha demostrado experimentalmente que *gef1* funciona como tal en la membrana plasmática. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que *gef1* forma un canal funcional cuando es expresado en ovocitos de *X. laevis*, y por otra parte, en otra serie de experimentos se mostró que bloqueadores de canales de Cl<sup>-</sup> inducen el fenotipo *petite* en

levaduras silvestres, tal es el caso del ácido carboxílico 9-antraceno (9AC) (López-Rodríguez A, trabajo no publicado).

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los CIC humanos activados por voltaje (hCIC-1 y hCIC-2) revierten el fenotipo *petite* de las levaduras mutantes *gef1*<sup>-</sup>.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Clonación de hClC-1 y hClC-2 en plásmidos de expresión en levaduras.
- 2. Expresión de hClC-1 y hClC-2 en la cepa RGY 192 (gef1<sup>-</sup>).
- 3. Comprobar por microscopía la reversión del fenotipo petite.
- 4. Medir los niveles de consumo de oxígeno (O<sub>2</sub>) de las cepas recombinantes.

## **HIPÓTESIS**

Dado que hClC-1 y hClC-2 se expresan en membrana plasmática, son activados por voltaje y comparten secuencias homologas a Gef1p éstos podrán revertir el fenotipo petite de cepas *gef1- de S. cerevisiae*.

#### JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por mutaciones en las secuencias que codifican para cada uno de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por voltaje son infrecuentes, sin embargo los tratamientos actuales no evitan el curso natural de la enfermedad y la mayoría de los pacientes muere hacia la tercera década de vida. Como se menciono anteriormente, defectos funcionales en ClC-1 resultan en hiperexcitabilidad eléctrica y como consecuencia relajación muscular y miotonía (enfermedad de Becker y de Thomsen). Por otro lado ClC-2 se encarga de la

regulación de la concentración de Cl<sup>-</sup> intraneuronal y algunas mutaciones producen epilepsia.

Una de las razones por las que la terapéutica empleada se ve mermada para combatir estas enfermedades es que aún no se conocen de forma exacta los procesos patológicos implicados en cada una de ellas. Luego entonces, es loable la preocupación por dilucidar los procesos no conocidos de la biología molecular implicada en estas patologías.

En este trabajo pretendemos conocer algunos de los mecanismos básicos de la función de los CICs y crear las bases de un sistema de expresión que permita evaluar fácilmente modificaciones en la actividad de estos canales. Los resultados obtenidos podrían contribuir al estudio y entendimiento de la terapéutica y de las bases moleculares de la función de dichos canales lo que nos dará herramientas para entender la patogenia de enfermedades causadas por mutaciones en los CIC (Chen TY, 2005; Jentsch *et al.*, 2002; Maduke *et al.*, 2000).

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### AMPLIFICACIÓN DEL DNA QUE CODIFICA PARA hCIC-1 y hCIC-2.

#### 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Como se mencionó anteriormente, la proteína hClC-1 se expresa de forma específica en músculo estriado (Steinmeyer *et al.*, 1991), por ende se requirió de la obtención de muestras de dicho tejido para, mediante la técnica de RT-PCR, obtener el DNAc que codifica para esta proteína. La obtención del tejido no fue posible y la técnica planeada se pudo sustituir por la clonación del DNAc a partir de una construcción plasmídica existente.

Para el caso de la proteína hClC-2, la cual se expresa de forma abundante en tejido encefálico (Skin *et al.*, 2000), se obtuvieron muestras de cerebelo y corteza cerebral de humanos adultos en el periodo inmediato post mortem bajo la autorización y supervisión del Servicio Médico Forense del Estado de Querétaro (SEMEFO). El tejido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C para su uso posterior.

#### 2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.

Esta técnica se realizó únicamente con el tejido donde se expresa hClC-2, y para ello se utilizó el método modificado de extracción de RNA total de tiocinato de guanidina ácido – fenol – cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987).

#### A. MATERIAL

Agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1% SEVAG: cloroformo y alcohol isoamílico (24: 1, v/v) Etanol 100% Etanol 75% en agua DEPC Isopropanol 100% Fenol saturado en agua DEPC Acetato de Sodio (2M, pH 4) Solución desnaturalizante (Solución D) Isotiocinato de guanidina 4M Citrato de sodio 0.75 M, pH 7 Sarcosyl: lauryl sarcosinato de sodio 10% β-mercaptoetanol 0.1 M

Para cada 300 mL de solución D se agregaron: 125 gr de isotiocinato de guanidina en 126.5 mL de agua DEPC, calentado a 65 °C para favorecer la disolución, 8.8 mL de citrato de sodio 0.75 M pH7 y 13.2 mL de sarcosyl al 10%. La mezcla fue almacenada a temperatura ambiente protegida contra la luz, siendo estable por tres meses bajo estas condiciones. Justo antes de su uso, a cada 50 mL de la solución D se agregaron 0.36 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sambrook y Russell, 2001).

#### **B. PROCEDIMIENTO**

La muestra se colocó en un tubo de polipropileno y por cada 100 mg de tejido se agregaron 3 mL de solución desnaturalizante (solución D), el tejido se pulverizó con un homogenizador de aspas de acero inoxidable por 30 segundos aproximadamente, el proceso se realizó cuatro veces manteniendo las muestras en hielo, acto seguido se agregaron 0.1 mL de acetato de sodio 2M (pH 4.0), 1 mL de fenol saturado en agua y 0.2 mL de Cloroformo-alcohol isoamílico (SEVAG), se agitó por 10 segundos y se incubó en hielo por 15 min.

Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10,000 g por 20 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 0.5 volúmenes de fenol saturado y de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezclaron los componentes por inversiones lentas y se centrifugó nuevamente a 10,000 g por 10 minutos a 4°C. La nueva fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo limpio y se le agregó un volumen igual de ispropanol. Se precipitó por tres horas a -20°C.

Al término de la precipitación cada muestra fue centrifugada a 10,000 g por 30 minutos a 4°C; el tubo fue decantado cuidando que el botón obtenido no se perdiera. De forma inmediata el botón se resuspendió en 0.3 mL del total de solución D inicial y se transfirió a tubos limpios de microfuga (en cantidades iguales). Las muestras fueron agitadas por vortex y precipitadas con un volumen igual de isopropanol por toda la noche a 4°C. Dichas muestras se centrifugaron a 14,000 g por 10 minutos a 4°C; los tubos se decantaron cuidando el botón de RNA el cual se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 75% por una sola ocasión. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos y pasado este tiempo se resuspendieron en 50  $\mu$ l de agua DEPC.

El RNA obtenido se usó de forma inmediata en ensayos de retrotranscripción o se almacenó a -70°C para su posterior utilización (Chomczynski y Sacchi., 1987; Sambrook y Russell., 2001).

#### 1. Observaciones

Se comprobó la integridad del RNA total a través de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en agua DEPC y se cuantifico su concentración en espectrofotómetro *Ultrospec 3000* (Pharmacia Biotech) obteniendo una relación de absorbancia entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm de 2.0.

#### 3. RETROTRANSCRIPCIÓN.

Se utilizó la técnica de RT-PCR con el uso del estuche comercial SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y RNA total.

#### A. MATERIAL

RNA total Amortiguador de templado primario 5X SuperScript II RT (200 U/µL) Invitrogen. Dithiothreitol (DTT) 0.1M. Invitrogen. Oligo (dT) 500 μg/mL. Invitrogen. Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs 10mM c/u) RNasa H (2 U/μL) Invitrogen. Tubos de polipropileno de 0.2 mL

## B. PROCEDIMIENTO

En un tubo de microfuga libre de nucleasas se agregaron: 1  $\mu$ l de Oligo (dT), 5  $\mu$ g de RNA total, 1  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs (10 mM cada uno) y 12  $\mu$ l de agua destilada estéril. La muestra se llevó hasta una temperatura de 65°C por 5 min y rápidamente se colocó en hielo, acto seguido, se colectó el contenido del tubo por centrifugación.

- Se agregaron a la mezcla anterior 4 μl de amortiguador de templado primario (5X)
  y 2 μl de DTT 0.1M. Se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos.
- 2. Se agregó 1 μl (200 unidades) de SuperScript <sup>™</sup> II RT y se mezcló por pipeteo al mismo tiempo.
- 3. Se incubó a 42°C por 50 min.
- Acto seguido, se inactivó dicha reacción elevando la temperatura hasta 70°C por 15 minutos.
- 5. Para remover el RNA complementario del cDNA obtenido se agregó 1 μl (2 U) de RNasa H de *Escherichia coli* y se incubó a 37°C por 20 min.

#### 1. Observaciones

El producto de este ensayo se utilizó de forma inmediata para amplificar el DNA que codifica para el hClC-2 o se almacenó a -70°C para su posterior uso (Sambrook y Russell, 2001).

## 4. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).

A partir de aquí y en adelante, los métodos descritos fueron aplicados tanto para hCIC-1 como para hCIC-2.

Tomando como base las secuencias de nucleótidos reportadas de hClC-1 (Koch *et al.*, 1992) y hClC-2 (Thiemann *et al.* 1992), se diseñaron los oligodesoxinucleótidos utilizados en este experimento (tabla 1).

Nombre	Tamaño (pb)	Tm **	% GC ***	Estructura secundaria	Dímeros	Secuencia
clcn1s	23	70.1	47.83	Débil	No	5'-AATATGGAGCAATCCCGGTCACA-3'
hCLC1	23	63.8	43.48	Moderada	No	5'-AAGGATCAGTTCATCCTCATCCT-3'
clcn2s	27	90.8	77.78	Muy fuerte	No	5'-GAGATGGCGGCCGGCGGCGGAGGAA-3'
hCLC2	24	77.7	54.17	Ninguna	No	5'-TTGGCATTTGTCGTCGCTGTCGGA-3'

\*\* Tm = temperatura media de amplificación

\*\*\* % GC = porcentaje de GC en la secuencia

Tabla 1. Propiedades de oligodesoxinucleótidos utilizados en la amplificación de hClC-1 y hClC-2.

#### A. MATERIAL

Amortiguador de PCR 10X [600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 180 mM de sulfato de amonio]

MgSO<sub>4</sub> (50 nM)

Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 10 mM c/u)

oligodesoxinucleótido 5'( $2.5 \mu$ M, ver tabla 1)

oligodesoxinucleótido 3' (2.5 µM, ver tabla 1)

Taq DNA polimerasa de alta fidelidad (5 U/µL) Invitrogen Cat. No. 11304-011

DNAc de la reacción de templado primario anterior

Agua destilada estéril

Tubos de polipropileno de 0.2 mL

#### **B. PROCEDIMIENTO**

Para cada reacción se agregaron a un tubo libre de nucleasas:  $5.0 \,\mu$ l de amortiguador de alta fidelidad de PCR 10X [1X final],  $2.0 \,\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> [1 nM final], 1 $\mu$ l de mezcla de dNTPs [0.2 mM final], 4 $\mu$ l de oligodesoxinucleótido 3' y 5' [0.2  $\mu$ M final], 0.2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa de alta fidelidad [1 u/ $\mu$ l final], 2-4  $\mu$ l de cDNA de hCIC-1 y hCIC-2 se aforó hasta 50  $\mu$ l con agua destilada estéril. Dicha mezcla se agitó gentilmente. Se inició la PCR en termociclador marca TECHNE (con No. de serie 124231-3) bajo las condiciones citadas enseguida.

*Amplificación de hClC-2*: etapa de desnaturalización 94°C por 30 segundos, alineamiento 63°C por 30 segundos, y extensión 68°C por 3 minutos; todo esto por 35 ciclos con una temperatura de de mantenimiento final de 4°C (Innis *et al.*, 1990). *Amplificación de hClC-1*: etapa de desnaturalización 94°C por 30 segundos, alineamiento 55°C por 30 segundos, y extensión 68°C por 3 minutos; todo esto por 35 ciclos con una temperatura de de mantenimiento final de 4°C (Innis *et al.*, 1990).

#### 1. Observaciones

Con el producto de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para comprobar la amplificación del DNA de hClC-1 y hClC-2.

Como método alternativo para la amplificación de hCIC-1 y hCIC-2 se utilizaron las construcciones plasmídicas pRc/CMV\_hCIC1 (proporcionada por el Dr. Al George) y pBK/RSV\_hCIC2 (proporcionada por el Dr. Gary Cutting). Se utilizó el mismo diseño de amplificación y de purificación de los amplicones.

CLONACIÓN DE hCIC-1 y hCIC-2 EN UN VECTOR TOPO DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS.

1. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.
Los productos de la amplificación arriba mencionada, se purificaron a partir del gel de agarosa al 0.8%, con un peso aproximado de 2.9 kb y 2.6 kb que corresponden al DNA de hClC-1 y hClC-2 respectivamente, bajo las condiciones del estuche de purificación de DNA QIAquick<sup>™</sup> (Qiagen, 2002). El resto fue almacenado a -70°C para uso posterior.

# A. MATERIAL

Estuche de purificación de DNA QIAquick™ (Qiagen, 2002) Hojas de bisturí nuevas Tubos de polipropileno de 1.5 mL Biofuga Kendro (No. de serie: 40333781)

# **B. PROCEDIMIENTO**

- 1. Se cortó el fragmento de DNA deseado, con una navaja de bisturí nueva.
- Se colocó el fragmento en un tubo estéril y se pesó su contenido, acto seguido se agregaron 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel (v/w: 300 μL/100 mg).
- 3. Con la ayuda de la pipeta se fragmentó y disolvió el gel por completo, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se verificó que el color de la solución fuera amarillo. Esto último indica que el pH de dicha solución es menor a 7.5, en caso contrario (color violeta) se agregaron 10 μL de acetato de sodio 3M pH 5.0.
- 4. Se agregó un volumen de isopropanol a la solución.
- 5. Se colocó la muestra en un tubo colector de 2.0 mL.
- Se vertió la solución en la columna y se centrifugo a 13,000 rpm por 1 minuto a 4°C.
- 7. Se desechó la solución filtrada y se colocó nuevamente la columna en el tubo colector.
- 8. Se agregaron 0.5 mL de amortiguador QG a la columna y se centrifugó por un minuto bajo las mismas condiciones.
- Fueron agregados a la columna 0.75 mL de amortiguador PE y se centrifugó la muestra por 1 minuto.
- 10.Se desechó la solución filtrada y se centrifugó nuevamente por un minuto.

- 11.La columna se colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL y se añadieron 30 μL de agua destilada estéril al centro del filtro de la columna.
- 12. Finalmente se centrifugó por un minuto y la muestra resultante se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

#### 1. Observaciones

Los fragmentos purificados fueron secuenciados y utilizados inmediatamente en un ensayo de ligación que se describe de forma detallada en el apartado siguiente.

## 2. CLONACIÓN DE AMPLICONES EN EL VECTOR pYES2.1/V5-HIS-TOPO<sup>®</sup>.

La mayoría de las DNA polimerasas termoestables, incluida la Taq DNA polimerasa, poseen actividad de transferasa terminal independiente del templado, que resulta en la adición de un solo tipo de nucleótido no apareado en los extremos 3' de los fragmentos de DNA amplificados. Dicho nucleótido es adicionado dependiendo de la base adyacente y de las bondades de la polimerasa utilizada, sin embargo, la adenina (A) es el nucleótido agregado de forma preferente por la Taq DNA polimerasa (Sambrook y Russell, 2001).

Dentro las estrategias utilizadas para la clonación de fragmentos de PCR amplificados por Taq polimerasa se encuentra la utilización de vectores linearizados con la enzima topoisomerasa I de *Vaccinia virus*, la cual funciona como una enzima de restricción y como ligasa. Esta topoisomerasa reconoce secuencias pentaméricas 5'-(C/T)CCTT-3' y forma enlaces covalentes con el grupo fosfato del extremo 3' de la timidina (T), de tal forma que permanece unida a cada una de las cadenas de DNA e impide que se unan nuevamente. Su actividad de ligasa la realiza al detectar secuencias con extremos compatibles, tal es el caso de los productos de amplificación por Taq polimerasa (Shuman, 1994).

# A. MATERIAL

DNA amplificado y purificado 25  $\mu$ g/mL

Tubos de polipropileno de 0.5 mL y 1.5 mL

Agua destilada estéril

Estuche pYES2.1 TOPO<sup>®</sup> TA Expresión

LB medio Amp+ y agar Amp+ (Apéndice A)

Soluciones para extracción de DNA (minipreparación)

Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0

Solución II: NaOH 0.2 M y SDS 1% (w/v)

Solución III: Acetato de potasio 5 M, Acido acético glaciar y agua destilada estéril Fenol saturado en agua SEVAG: cloroformo y alcohol isoamílico (24: 1, v/v)

Etanol 100%

Etanol 75% (en agua destilada estéril)

# **B. PROCEDIMIENTO**

# 1. Ligación

Dicha reacción se realizo bajo las siguientes condiciones: en un tubo de microfuga de 0.5 mL se agregaron 1  $\mu$ L del producto de PCR, amplicones de hClC-1 y hClC-2, 1  $\mu$ L de solución salina, 1  $\mu$ L del plásmido pYES.TOPO<sup>®</sup> y 5  $\mu$ l de agua destilada estéril. La mezcla anterior se agitó gentilmente y se incubó por 30 min a temperatura ambiente (22-23°C). La reacción se mantuvo en hielo para los siguientes procesos (Invitrogen, 2001).

Los oligodesoxinucleótidos específicos para la clonación de hClC-1 y hClC-2 se diseñaron (Innis *et al.*, 1990) de tal manera que se removió el codón de terminación de la transcripción y el marco de lectura abierto quedó en fusión con la región V5 del plásmido pYES.TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, figura 4 y tabla 2).

Figura 4. Mapa funcional de pYES.TOPO<sup>®</sup>. Este vector-T permite la inserción de productos de PCR. Porta los elementos necesarios para la replicación en *E. coli y S. cerevisiae*, además de un promotor transcripcional inducible. Estos y otros elementos se detallan en la tabla 2.



Elemento	Bases	Características		
		Permite la inducción de expresión de los genes		
Promotor GAL1	1-451	clonados dentro de pYES.TOPO <sup>®</sup> en presencia de		
		galactosa.		
Promotor T7	475-494	Permite la transcripción in vitro con la RNA pol de T7.		
	512-513	Permite la inserción del producto de PCR dentro del		
Sitio de clonación TOPO <sup>®</sup>		marco C-terminal del epítope V5 y la señal de		
		polihistidina.		
Enítope V5	543-584	Permite la detección de la fusión proteica con el		
		anticuerpo Anti-V5.		
Señal polihistidina C-terminal	594-611	Permite la purificación de la fusión de proteína con una		
(6xHis)	004 011	resina metal-quelada.		
Señal de terminación de la	633-886	Permite una terminación eficiente y estabilización del		
transcripción CYC1		RNAm.		
Origen pUC	1068-1741	Mantiene una alta eficacia de replicación en E. coli.		
Gen de resistencia a ampicilina	1886-2746	Selección de las bacterias transformadas de E. coli.		
Gen LIRA3	2764-3645	Selección de las levaduras transformadas en un medio		
	2104-0040	deficiente en uracilo.		
Origen 2µ	3875-5346	Origen de replicación en levaduras.		
Origen <i>f1</i>	5414-5869	Sitio de rescate de la hebra monocatenaria de DNA.		

Tabla 2. Descripción de los elementos constitutivos del vector pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>.

#### 2. Transformación

El proceso de transformación se hizo con el siguiente protocolo. Se tomaron 2  $\mu$ l de la reacción de ligación anterior y se agregaron a un vial de bacterias *E. coli* Top 10 (50  $\mu$ l) mezclando gentilmente. Se incubaron en hielo por 15-30 min y de forma inmediata se realizó un choque térmico a 42°C por 0.5-1 min. Acto seguido, los tubos de la reacción se colocaron en hielo.

Después de algunos minutos se agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC (Apéndice A) y se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 37°C por un periodo de 60 minutos. Se tomaron 50  $\mu$ l de la reacción resultante y se expandieron en placas con medio de cultivo selectivo (LB Amp<sup>+</sup>), dejándolas en incubación a 37°C por 12 horas aproximadamente (Sambrook y Russell, 2001).

Para el análisis de clonas positivas se hizo un tamizaje de las colonias resultantes del ensayo anterior y se cultivaron en 3 mL de medio LB Amp<sup>+</sup> (50  $\mu$ g/ mL) por 12 horas en agitación continua a 37°C. La obtención de DNA plasmídico se realizo por el método de lisis alcalina (Birnboim, 1983), y el análisis de las construcciones plásmídicas pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO y pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO mediante restricción enzimática (Sambrook y Russell, 2001).

#### 3. Extracción de DNA plasmídico

Se tomaron 1.5 mL de cada clona propagada en 3 mL de LB Amp+, arriba mencionado, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C y de forma sistemática se siguió el proceso siguiente para cada una de las muestras (modificado de Sambrook y Russell, 2001):

- 1. Se agregaron 100 μL de solución I a cada pastilla de bacterias y se resuspendieron en ducha solución.
- Se agregó un volumen de 200 μL de solución II, se mezcló por inversiones durante 10 segundos y se incubó a 4°C por 3-5 minutos.

- Al término de este tiempo se agregaron 150 μL de solución III (fría), se mezcló por inversiones durante 15 segundos y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- 4. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de fenol y otro de SEVAG.
- 5. La mezcla se agitó de forma intensa y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones.
- 6. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se le agregaron dos volúmenes de etanol 100%, para precipitar las moléculas DNA.
- 7. Las muestras se incubaron por 30 min a -70°C y pasado dicho tiempo se volvieron a centrifugar. La pastilla de DNA quedó colectada en el fondo del tubo y el resto de la solución fue desechado, tratando de no perder mencionada pastilla.
- 8. Cada muestra de DNA se lavó en una ocasión con 200 μL de etanol y se centrifugó bajo las mismas características.
- 9. La pastilla de DNA se seco a 37°C por 10 min.
- 10. Finalmente, cada pastilla de DNA se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua destilada estéril y se almacenaron a -20°C.

#### a. Observaciones

Para identificar las clonas con las construcciones correctas, se realizó un tamizaje inicial del DNA plásmidico y posteriormente se analizaron las muestras por restricción enzimática, para que al final se comprobara su identidad por secuenciación.

#### 4. Restricción enzimática

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias cortas de DNA y cortan la doble cadena del mismo en sitios específicos dentro de la secuencia reconocida o adyacente a ella. Esta propiedad las hace una estrategia de gran utilidad para el análisis y caracterización de construcciones plasmídicas y DNA nativo. En este caso, fueron utilizadas las enzimas *Bg/*II, *Xba*I, *Not*I y *Sca*I para caracterizar las

construcciones pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO y pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO (Sambrook y Russell, 2001).

Para cada reacción de 20  $\mu$ L, se agregó a un tubo de polipropileno de 1.5 mL: 0.5 mL de endonucleasa, 2.0 mL de amortiguador, 5 mL de DNA plasmídico y 12.5 mL de agua destilada estéril. Esta mezcla se incubó por 1.5 horas a 37°C, pasado este tiempo se inactivó la reacción y se almacenó a -20°C.

#### a. Observaciones

La caracterización enzimática se realizó en dos pasos para cada construcción, ello por incopatibilidad de soluciones amortiguadoras. Los fragmentos resultantes de la restricción fueron analizados en gel de agarosa al 0.8% y así se confirmó la identidad de cada clona. Además se determinó la secuencia de nucleótidos de estas construcciones.

EXPRESIÓN DE hClC-1 y hClC-2 EN S. cerevisiae.

# 1. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS LITIO-COMPETENTES.

Las construcciones plasmídicas anteriores se utilizaron para la transformación de las clonas de *S. cerevisiae* RGY 30 (*WT*) con genotipo *MATa ura3-1; leu2-3,112; trp1-1; his3-11, 15* y RGY 192 (*gef1*<sup>-</sup>) cuyo genotipo es *MATa gef1::HIS3, leu2-3,112; trp1-1; his15*. Esto es posible gracias a las características del vector utilizado en las construcciones arriba mencionadas.

Para evaluar los requerimientos indispensables para el crecimiento de una clona particular, es necesario el uso de un medio en el cual las auxotrofías estén suplementadas excepto aquella de interés. En este caso el vector de expresión en levaduras pYES2.1 provee un gen que permite la síntesis de uracilo, es decir: que la levadura transformada con dicho vector puede crecer en un medio sin uracilo.

# A. MATERIAL

Tubos de polipropileno de 50 mL Medio de cultivo YPD (Apéndice A) Estuche de Transformación *S. c.* EasyComp<sup>™</sup> (Invitrogen) Medio de cultivo SC-U agar (Apéndice A) DNA plasmídico (1 µg/µL)

# **B. PROCEDIMIENTO**

# 1. Preparación de levaduras competentes

Uno de los métodos utilizados para permitir la competencia celular a ser transformadas es a través de la utilización de acetato de litio (LiAc), así lo refiere Guietz (1995). El método se aplicó en la forma siguiente:

- 1. Se inoculó una colonia en 10 mL de YPD de cada cepa de *S. cerevisiae* y se incubó por toda la noche a 30°C en agitación (250-300 rpm).
- Se determinó la densidad óptica del cultivo a 600 longitudes de onda (OD 600) en espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech). Es se utilizó de forma preferente una OD de 3-5.
- 3. El cultivo anterior se diluyó hasta alcanzar un OD <sub>600</sub> de 0.2-0.4 en un volumen total de 10 mL de YPD.
- El cultivo fue incubado nuevamente, bajo las mismas condiciones, hasta alcanzar un OD 600 de 0.6- 1.0. Esto sucedió entre 3 y 6 horas.
- 5. Las células fueron empaquetadas por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado.
- 6. El paquete celular fue resuspendido en 10 mL de solución I y empaquetadas nuevamente (mismas condiciones). El sobrenadante fue desechado.
- 7. Se resuspendió el paquete celular en 10 mL de Solución II y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ L en tubos de polipropileno de 1.5 mL.

#### a. Observaciones

En este punto las levaduras eran ya competentes y fueron utilizadas de forma inmediata en ensayos de transformación o almacenadas a -80°C para su uso posterior. Nunca se utilizaron levaduras de más de 6 meses de antigüedad.

## 2. Transformación

Este método es útil tanto para transformar células frescas, como para células almacenadas a –80°C. Cabe señalar que la eficiencia de transformación disminuye con la congelación y descongelación continuas de las alícuotas. Además del DNA de las construcciones que incluyen las proteínas en estudio, se utilizó DNA plasmídico sin inserto alguno.

Antes de iniciar se equilibró la Solución III (*S. c.* EasyComp<sup>TM</sup>) a temperatura ambiente, lo mismo se hizo con las alícuotas de células competentes y con las cajas de cultivo SC-U (una para cada transformación).

- 1. A cada alícuota de células competentes se agregaron 5  $\mu$ L de DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ L).
- 2. Se agregaron 500  $\mu$ L de Solución III a cada tubo y se mezcló de forma vigorosa.
- Dicha mezcla se incubó por 1.5 horas a 30°C con agitación vigorosa cada 15 minutos. Si las muestras no son agitadas, disminuye el número de transformantes.
- Se vertieron y dispersaron 100 μL de cada transformación en cajas de cultivo SC-U. Las placas fueron incubadas a 30 °C por al menos 3 días.

#### a. Observaciones

Las colonias que crecieron en este medio sin uracilo, fueron sometidas a una segunda selección en medios de restricción. Estos medios además de no estar adicionados con uracilo, tampoco poseían histidina, leucina o triptofano (Apéndice A); de tal forma que aquellas levaduras que crecieron en medio SC-U, no lo hicieron en los otros medios SC.

# 2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CLONADAS.

Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas hClC-1 y hClC-2. En *S. cerevisiae* típicas que se han utilizado en ensayos de laboratorio, la transcripción del promotor *GAL1* se reprime en presencia de glucosa (West *et al.*, 1984). Luego entonces al remover la glucosa y agregar galactosa como fuente de carbono se induce dicha transcripción en un tiempo de 2-4 horas (Giniger *et al.*, 1985). Por ende, si mantenemos las levaduras transformadas en un medio rico en glucosa, la transcripción de *GAL1*, junto con la proteína clonada (hClC-1 o hClC-2) será reprimida completamente y su expresión será activada e inducida al cambiar a un medio rico en galactosa.

## A. MATERIAL

Levaduras transformadas Cajas con medio SC-U más galactosa Medio SC-U más galactosa Ferrocina 1mM Medio enriquecido (YPD)

# **B. PROCEDIMIENTO**

- 1. Inducción en medio líquido para obtención de proteínas
- Se inoculó una sola colonia de las clonas RGY 192 y RGY 30, ya transformadas con la construcción pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO y pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO o pYES2.1/V5-His-TOPO (como control) en 15 mL de medio SC-U con 2% de glucosa o en medio YPD (Apéndice A).
- 2. Se incubaron por toda la noche a 30°C en agitación continua.
- 3. Se determinó la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) y calculó la cantidad de cultivo necesario para obtener una OD<sub>600</sub> de 0.4 en 50 mL de medio de inducción para una

segunda selección. Las células se recuperaron por centrifugación a 7,500 *g* por 5 minutos a 4°C.

- 4. Estas células fueron resuspendidas, en 1-2 mL de medio SC-U con 2% de galactosa y ferrocina, e inoculadas en 50 mL del mismo medio dejándolas crecer en agitación continua a 30°C. Subsecuentemente fueron removidos 5 mL del cultivo a las 0, 4, 8, 12, 16 y 24 horas, y determinado el OD<sub>600</sub> de cada muestra.
- 5. Las células se centrifugaron a 7,500 g por 5 minutos a 4°C.
- El botón obtenido se resuspendió en 500 μl de agua destilada estéril, y transferidos a tubos limpios de microfuga para una nueva centrifugación por 30 segundos.

Las células resultantes se utilizaron de forma inmediata para realizar la inmunodetección de la proteína, o se almacenaron a -80°C para su uso posterior (Invitrogen, 2001).

#### a. Observaciones

Las alícuotas deben ser congelas de forma inmediata y preferentemente en hielo seco, esto permite un mayor tiempo de almacenaje, hasta 6 meses.

#### 2. Inducción en medio sólido para análisis macroscópico

De las clonas seleccionadas, se tomó una de las colonias directamente de las placas SC-U y se sembró en forma de estrías en ocho en placas SC-U con galactosa al 2%. Las placas se incubaron a 30°C por 1-3 días. Los cultivos fueron vigilados cada 8 horas para registrar la tasa de crecimiento.

# DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS hCIC-1 y hCIC-2.

Para la detección de las proteínas recombinantes se realizó la técnica de 'Western Blot' (Ausubel et al., 1994; Sambrook y Russell, 2001), a partir de un extracto crudo de proteínas que se obtuvo por lisis celular bajo agitación con esferas de cristal ácidas (Bollag *et al.*, 1996). El extracto crudo de proteínas se precipitó con acetona

(Hames, 1981), y se determino la concentración de las mismas mediante el método de Bradford utilizando una curva estándar de albúmina (Bradford, 1976).

1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR LISIS CELULAR CON ESFERAS DE CRISTAL ÁCIDAS.

La acción abrasiva durante la lisis celular con las esferas de cristal, permite liberar el contenido citoplasmático de las mismas. Este método se aplica principalmente a organismos unicelulares, de forma particular a levaduras (Schatz, 1979). De igual forma, el método es descrito para muestras pequeñas (hasta 3 gramos), donde el total de la reacción puede llevarse a cabo en un solo tubo.

A. MATERIAL

Solución de lisis celular (Apéndice B)

Fosfato de sodio 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM Glicerol 5% PMSF 1 mM

Esferas de cristal (0.4 - 0.6 mm; Sigma-Aldrich, Catalogo No. G-8772) Tubos de polipropileno de 1.5 mL con levaduras sometidas a inducción (100 mg)

# B. PROCEDIMIENTO

- Se resuspendió cada alícuota de levaduras congeladas en 500 μL de solución de lisis. Se centrifugaron a 7,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- Se removió el sobrenadante y las levaduras se resuspendieron en un volumen de solución de lisis necesario para obtener una OD<sub>600</sub> de 50-100. Se usan los valores de OD<sub>600</sub> determinados en el procedimiento anterior.
- 3. Fue agregado un volumen igual de esferas de cristal ácidas.
- La mezcla anterior se mantuvo agitación continua por al menos 30 minutos a 4°C. Se verificó la eficiencia de lisis al observar una muestra bajo microscopio y determinar la formación de esferoplastos.
- 5. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, aquí se encuentra ya el extracto crudo de proteínas.

#### 1. Observaciones

La concentración de proteínas se determinó a una OD<sub>595</sub> en espectrofotómetro *Ultrospec 3000* (Pharmacia Biotech), con el procedimiento arriba mencionado. Las esferas de cristal fueron recuperadas, lavadas con agua destilada y almacenadas a temperatura ambiente para uso posterior.

Una alternativa para la obtención del extracto crudo de proteínas fue el método reportado por Kushnirov (2000). Con el cual se disminuye el tiempo de obtención de proteínas totales y se mejora la concentración de las mismas.

2. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (poliacrilamida-SDS).

El ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio duodecil sulfato (SDS-PAGE), además de tener un bajo costo, es reproducible y un método rápido para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Este método permite separar proteínas en base a su peso molecular. El SDS se une a la porción hidrofóbica de la proteína, rompe su estructura plegada y le proporciona estabilidad en su conformación extendida en medios solubles. Como resultado, la longitud del complejo proteína-SDS es proporcional a su peso molecular (Bollag *et al.*, 1996).

A. MATERIAL (Apéndice A)

Arcrilamida/bis-acrilamida TRIS-HCI 1.5 M pH 8.8 TRIS-HCI 0.5 M pH 6.8 SDS 10% Amortiguador de muestra 1X Amortiguador de corrida pH 8.3 Persulfato de amonio 10% Tetra-metil-etilendiamina (TEMED) Extracto de proteínas (20 μg/muestra) Solución para teñir y desteñir

# **B. PROCEDIMIENTO**

Los reactivos se deben preparar con antelación, excepto el persulfato de amonio que debió prepararse justo antes del ensayo.

 Se preparó el gel separador inferior y se dejó polimerizar por 5-10 minutos, enseguida se preparó el gel concentrador superior esperando un tiempo igual para su polimerización (tabla 3 y 4).

Depativa	Concentración 7 E 0/	Concentración 12 %	Concentración 15
Reactivo	Concentración 7.5 %	Concentración 12 %	%
Agua destilada	4.85 mL	3.35 mL	2.35 mL
TRIS-HCI 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	100 μL	100 μL	100 μL
Arcrilamida/bis-acrilamida	2.5 mL	4.0 mL	5.0 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μL	50 μL	50 μL
TEMED	5 μL	5 μL	5 μL

Tabla 3. Reactivos para gel separador (inferior) y concentración de la mezcla. Receta para 2 geles.

Reactivo	Para 4 geles	Para 2 geles
Agua destilada	6.1 mL	3.05 mL
TRIS-HCI 0.5 M pH 6.8	2.5 mL	1.25 mL
SDS 10%	100 μL	50 μL
Arcrilamida/bis-acrilamida	1.3 mL	0.65 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μL	25 μL
TEMED	10 μL	5 μL

Tabla 4. Reactivos para gel concentrador (superior).

- 2. Cada muestra se aforó a 20  $\mu$ L con agua destilada estéril y se agregaron 4  $\mu$ L de amortiguador de muestra 5X.
- 3. Las muestras se incubaron a 95 °C por 5 minutos, se centrifugaron por 30 segundos a 6,000 rpm y se colocaron en hielo.
- Cada muestra se depositó en uno de los pozos en el siguiente orden: marcador de peso molecular (BenchMarck<sup>™</sup> Presteined), RGY 30\_pYES, RGY 30\_hClC1, RGY 30\_hClC2, RGY 30\_*LacZ*, RGY 192\_pYES, RGY 192\_hClC1, RGY 192\_hClC2, RGY 192\_*LacZ*.
- El ensayo de electroforesis se corrió a 80 volts hasta que las muestras rebasaran el gel concentrador. Después de esto, el voltaje se aumentó a 110-130 volts. La duración fue de 2 horas aproximadamente.
- El ensayo se hizo por duplicado, uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones semisecas según los parámetros descritos por Jacobson y Karrsnas (1990).

# 1. Observaciones

Para el método alternativo de extracción de proteínas, se depositaron 30 mL de muestra en cada pozo. En ambos casos, la transferencia se realizó con un amperaje de 0.8-1.0 mA/cm<sup>2</sup> de gel y un voltaje de 6 V/cm del lado mayor del gel.

# 3. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Después de la transferencia en condiciones semisecas, la detección del epítope de interés se realizó en tres pasos. Primero, la membrana de nitrocelulosa se incubó con un anticuerpo primario; enseguida, se utilizó un anticuerpo secundario el cual reconoce un epítope sobre el anticuerpo inicial. En la mayoría de los casos el anticuerpo secundario esta conjugado con un agente cuantificable, tal es el caso de la enzima peroxidasa. Este marcador se puede visualizar por una reacción colorimétrica (el ultimo paso) catalizada por la misma enzima y cuyo producto es un colorante que permanece adherido a la membrana de nitrocelulosa (Bollag *et al.*, 1996).

## A. MATERIAL

Tris Buffer Salino (TBS; Apéndice B) TBS/T (TBS 1X, Tween-20 0.1%) Solución de bloqueo (Apéndice B) 6X-HIS Epítope Tag (1 ng/mL) Mouse anti-rabbit IgG-R (1 ng/mL)

# **B. PROCEDIMIENTO**

Para detectar la proteína en la membrana de nitrocelulosa se utilizó el anticuerpo primario policional desarrollado en conejo 6X-HIS Epítope Tag™ (Affinity BioReagements) dirigido de forma específica contra la cola de polihistidina del plásmido pYES.TOPO<sup>®</sup>, bajo las especificaciones del laboratorio de procedencia. Transcurrido el tiempo suficiente para la unión (12 horas a 4°C en agitación lenta), la membrana se lavó (3 veces por 5 minutos cada una) con TBS más Tween 20 al 0.1% para eliminar el anticuerpo primario no fijado.

A continuación, la membrana se incubó por 12 horas a 4°C con un segundo anticuerpo que reconoce al Epítope 6X-HIS (IgG-AP anticonejo desarrollado en cabra, Santa Cruz Biotechnology, inc). Este segundo anticuerpo se encuentra unido por enlaces covalentes a una fosfatasa alcalina que cataliza una reacción cromógena ante el sustrato adecuado.

La membrana se lavó por segunda ocasión con la misma solución y por el mismo tiempo. Por último, se agregó el sustrato para la fosfatasa alcalina (BCIP/NBT BLUE, Sigma) con el cual se forma un precipitado color púrpura oscuro que señala la banda que contiene la proteína buscada. Métodos descritos por Bollag (1996) y Sambrook y Russell (2001).

#### 1. Observaciones

Se evaluaron diversas concentraciones de proteínas y anticuerpos para estandarizar el procedimiento; los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones mayores a 20 mg/mL de proteínas.

# DETERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE hCIC-1 y hCIC-2: RT-PCR.

La sensibilidad de este método permite recuperar y clonar el extremo 5' y 3' de RNA mensajeros y generar librerías de cDNA, aún cuando las concentraciones de RNAm sean muy pequeñas. En este caso se utilizó RNA total y oligodesoxinucleótidos hexaméricos para generar el templado primario; la amplificación de hClC-1 y hClC-2 se diseñó con oligodesoxinucleótidos específicos (Sambrook y Russell, 2001).

# 1. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

# A. MATERIAL

Oligodesoxinucleótidos hexaméricos (50 ng/μL) RNA total (1-5 μg/μL) Mezcla de dNTPs (10 mM c/u) Agua destilada estéril Amortiguador de templado primario (5X) DTT (0.1 M) Transcriptasa inversa (RT, 200 U/μL) Tubos de polipropileno de 0.5 mL

# B. PROCEDIMIENTO

Para cada reacción se agregó 1  $\mu$ L de oligodesoxinucleótidos hexaméricos, 5  $\mu$ L de RNA total, 1  $\mu$ L de dNTPs y 13 mL de H<sub>2</sub>0 destilada estéril, esta mezcla se incubó por 5 minutos a 65°C.

La mezcla se colocó en hielo y se agregaron 4  $\mu$ L de amortiguador de templado primario y 2  $\mu$ L de DTT, la mezcla se incubó por 2 minutos a 42°C.

Se agregaron 200 U de RT, se incubó por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C.

La mezcla resultante (templado primario) se almacenó a -70°C.

# 1. Observaciones

El cDNA resultante fue utilizado para amplificar un fragmento de la secuencia de nucleótidos de hCIC-1 y hCIC-2 por PCR.

# 2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAN PARA hCIC-1 Y hCIC-2.

Uno de los procesos mínimos necesarios para la síntesis de proteínas es la generación de RNA a partir de DNA (transcripción), cuyo producto primario (transcrito) debe sufrir un procesamiento (maduración) para poder ser traducido. Para determinar la existencia del transcrito, se diseñaron iniciadores específicos que amplificaron 414 pb para hCIC-1 y 695 pb para hCIC-2 (tabla 5) del extremo 3' de las secuencias de nucleótidos de los hCICs (Sambrook y Russell, 2001).

# A. MATERIAL

Amortiguador de PCR (10X) MgCl<sub>2</sub> (50 mM) Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 10 mM c/u) Oligodesoxinucleótidos 3´ (2.5 μM, ver tabla 5) Oligodesoxinucleótidos 5´ (2.5 μM, ver tabla 5) *Taq* DNA polimerasa (5 U/μL) Invitrogen DNAc de la reacción de templado primario Agua destilada estéril Tubos de polipropileno de 0.2 mL

Nombre	Tamaño (pb)	Tm **	% GC ***	Estructura secundaria	Dímeros	Secuencia
hCIC1p5	21	70.2	61.90	Moderada	No	5'-GTGACCAGCATGGGGAAGCTC-3'
hCLC1	23	63.8	43.48	Moderada	No	5'-AAGGATCAGTTCATCCTCATCCT-3'
hClC2p4	21	63.8	57.14	Moderada	No	5'-CTAGCCCTGAGGCTTCTGTCT-3'
hCLC2	24	77.7	54.17	Ninguna	No	5'-TTGGCATTTGTCGTCGCTGTCGGA-3'

\*\* Tm = temperatura media de amplificación

\*\*\* % GC = porcentaje de GC en la secuencia

Tabla 5. Propiedades de oligodesoxinucleótidos utilizados en la amplificación de los extremos 3' de hClC-1 y hClC-2.

## **B. PROCEDIMIENTO**

Para cada reacción se agregaron a un tubo libre de nucleasas:  $5.0 \,\mu$ l de amortiguador de PCR 10X [1X final],  $3.5 \,\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> [1 nM final], 1 $\mu$ l de mezcla de dNTPs [0.2 mM final], 4 $\mu$ l de Oligodesoxinucleótidos 3' y 5' [0.2  $\mu$ M final], 0.2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa [1 u/ $\mu$ l final], 2  $\mu$ l de cDNA de hClC-1 y hClC-2 (el 10% de la reacción de templado primario), y se aforó hasta 50  $\mu$ l con agua destilada estéril. Dicha mezcla se agitó gentilmente. Se inició el ensayo de PCR en termociclador marca TECHNE (con No. de serie 124231-3) bajo las condiciones citadas enseguida.

*Amplificación de hClC-1 y hClC-2*: etapa de desnaturalización 94°C por 30 segundos, alineamiento 55°C por 30 segundos, y extensión 72°C por 45 segundos; todo esto por 30 ciclos con una temperatura de de mantenimiento final de 4°C (Innis *et al.*, 1990).

#### 1. Observaciones

Con el producto resultante se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 8 % para confirmar la amplificación de los extremos 3' del DNA de hClC-1 y hClC-2.

# ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS LEVADURAS RECOMBINANTES.

Como se ha mencionado, la cepa RGY 192 produce colonias petite cuando se cultiva en medios con fuentes de carbono no fermentables; no así para la cepa RGY 30. Luego entonces, se tomaron clonas de las cepas RGY 192 (gef1<sup>-</sup>) y RGY 30 (*wt*) de levaduras transformadas con la construcción pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO, pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO y como control negativo el vector pYES2.1 cerrado (sin inserto). Todas estas fueron cultivadas tanto en medio SC-U líquido o sólido (Apéndice A) como en medio enriquecido.

# 1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Para determinar si las colonias formadas por las cepas recombinantes son *petite* o no, se analizó el tamaño de las mismas, en condiciones de cultivo con medio SC-U y enriquecido.

# A. MATERIAL

Cajas de cultivo con medio SC-U adicionadas con 2% de glicerol, 2% de etanol, 2% de galactosa y ferrocina 1 mM Cepas recombinantes Asa bacteriológica de aro (aluminio) Mechero Campana de flujo laminar

#### **B. PROCEDIMIENTO**

Se pasó por el mechero el asa bacteriológica, hasta que el aro estuvo al rojo vivo. Se dejó enfriar por algunos segundos y se tocó con el aro una de las colonias seleccionadas.

Se sembró en la caja de cultivo en forma de estrías en ocho (todo se hace dentro de un área estéril).

Las cajas se incubaron a 30°C por 1-3 días.

Se tomaron fotografías de los cultivos con microscopio OLYMPUS BX-60 con el objetivo de 10X.

## 1. Observaciones

La definición de las colonias es mejor a las 24 horas de incubación. El tamaño de las mismas se midió y reportó en micras.

# 2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la selección e inducción de la expresión de proteínas. De las clonas cultivadas en medios líquidos SC-U y enriquecido, se tomaron 10  $\mu$ L de cada una y se montaron las preparaciones para observarse en microscopio OLYMPUS BX-60 con un aumento de 100X. Bajo estas condiciones se hizo la medición de todas las levaduras que se observaron en cada uno de los campos seleccionados al azar, 100 células de cada una de las clonas de tres transformaciones independientes. Para las observaciones estadísticas de dichos valores, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y como complemento la prueba de Tukey para muestras iguales (Zar, 1999).

# CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE O2 DE LAS CEPAS RECOMBINANTES.

La medición de consumo de oxigeno ( $O_2$ ) en células intactas se determinó a 30°C, se usó un sistema que incluía un electrodo para  $O_2$ , un baño estándar y un monitor de  $O_2$  biológico (YSI Benchtop Model 5300 Biological Oxygen Monitor).

Las levaduras fueron cultivadas en medio YNB-U más dextrosa (2%) hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 3 aproximadamente. En este punto se agregó nocodazol (1.5 mg/mL en 1% de dimetilsulfóxido, DMSO) para sincronizar a todas las levaduras en la fase M del ciclo celular. El periodo de exposición al nocodazol fue de 4 horas. Enseguida las levaduras se colectaron por centrifugación a 1,000 *g* por 5 min a 4°C, se lavaron en dos ocasiones con agua bidestilada estéril a razón de una quinta parte del volumen primario de medio YNB-U más dextrosa. Se resuspendieron en YNB-U más galactosa (2%) y ferrocina (1mM) y se cultivaron por 4 horas más.

Se realizó conteo celular con cámara de Neubauer de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Optik Labor) para determinar el número de células por mL de cultivo y hacer la corrección al momento de cuantificar el consumo de  $O_2$ .

La mezcla para la reacción de consumo de  $O_2$  se realizó en 3 mL de medio YNB-U más ferrocina (1mM) limpio y equilibrado a 30°C. El rango de consumo de  $O_2$  de las levaduras fue calculado de la pendiente resultante del % de  $O_2$  consumido/min. (Greene *et al.* 1993; Hernandez-Muñoz *et al.*, 1992).

#### RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE RNA Y OBTENCIÓN DE DNAc DE hCIC-1 Y hCIC-2.

Se obtuvo el RNA total de tejido encefálico (figura 4a) con el cual se realizaron ensayos de RT-PCR para obtener el DNAc de hCIC-2, su amplificación fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, puesto que el DNA que codifica para hCIC-2 es de 2697 pb, se esperaría obtener una banda con un peso aproximado, y así ocurrió con dos de tres ensayos (figura 4b).



Figura 4. a) RNA total obtenido a partir de tejido encefálico. b) Amplificación de un DNAc obtenido por RT-PCR a partir de tejido encefálico; la punta de flecha señala una banda que corresponde al tamaño aproximado de hCIC-2 (2697 pb).  $\lambda$ -*Pst* l como marcador de peso molecular.

El método se facilitó gracias a la adquisición de las construcciones plasmídicas pRc/CMV\_hClC1 y pBK/RSV\_hClC2. Con estas se pudo amplificar, de forma más rápida y efectiva, el DNA de hClC-1 y hClC-2 (figura 5). Las condiciones para la PCR fueron las mismas.



2-Psti hCIC-1 hCIC-2

Figura 5. Amplicones que corresponden a los tamaños aproximados de hClC-1 (2967pb) y hClC-2 (2697 pb). λ-Pst I como marcador de peso molecular.

#### SECUENCIACIÓN.

Para comprobar la clonación de los hCIC, y descartar la existencia de mutaciones creadas por el proceso de amplificación, se utilizó una batería de seis oligodesoxinucleótidos, cada uno a una distancia de entre 500 y 550 pb. Como resultado de esto, se determinó una correcta clonación tanto de hCIC-1 como de hCIC-2.

#### CLONACIÓN DE hCIC-1 Y hCIC-2 EN EL VECTOR pYES2.1-V5-His-TOPO.

Los amplicones arriba mencionados, se purificaron a partir del gel de agarosa (0.8 %), se secuenciaron y se realizo la reacción de ligación con el vector de expresión pYES2.1-V5-His-TOPO<sup>®</sup> bajo las condiciones ya descritas.

Con estas ligaciones (pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO y pYES2.1 hClC-2 V5-His-TOPO) se transformaron células E. coli TOPO 10 (tres transformaciones independientes por cada ligación), además de una transformación control solo con el vector pYES2.1-V5-His-TOPO.

De estas transformaciones se obtuvo el DNA plasmídico de algunas colonias para su caracterización por medio de análisis de restricción enzimática, demostrando la correcta dirección de ligación de los insertos hClC-1 y hClC-2 en el vector mencionado.

La caracterización de las clonas transformadas con la construcción pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO se realizó con las enzimas de restricción *Xba*I (5'-T<sup>°</sup>CTAG<sub>A</sub>A-3'), que presenta un solo sitio de corte a nivel del nucleótido 619, y *Bgl*II (5'-A<sup>°</sup>GATC<sub>A</sub>T-3') también con un sitio de corte en el nucleótido 2153. Las clonas con un inserto en orientación correcta liberaron dos fragmentos, uno de 7933 pb y otro de 920 pb; en caso contrario se liberarían fragmentos de 6595 pb y 2259 pb (figura 6).



Figura 6. Caracterización enzimática de las clonas transformadas con la construcción pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO. A) Se señalan los sitios de corte para las enzimas de restricción *Bgl*II y *Xba*I. Se muestra el promotor T7, la señal de polihistidina C-terminal (6xHis) y la señal de paro de la transcripción. La construcción es de 8853 pb. B) 1, *A Pst*I como escala. 2 y 3, las clonas que liberan los dos fragmentos de DNA con los pesos esperados para una dirección adecuada de ligación del inserto hClC-1 (arriba mencionado).

Por otro lado, la caracterización de las clonas transformadas con la construcción pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO se realizo con las enzimas *Not*l (5´-GC<sup>°</sup>GGCC<sub>4</sub>GC-3´) con un solo sitio de corte localizado en el nucleótido 5 del inserto, y *Sca*l (5´-AGT<sup>°</sup><sub>4</sub>ACT-3´) con dos sitios de corte localizados en los nucleótidos 2440 y 3333 del plásmido. Si la construcción pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO es adecuada se liberaran los tres fragmentos siguientes: uno de 4620 pb, otro de 3070 pb y uno más de 893 pb. En caso contrario, si la ligación del inserto fue en orientación contraria, los fragmentos liberados serán de 5757 pb, 1933 pb y 893 pb cada uno (figuras 7).



Figura 7. Caracterización enzimática de las clonas transformadas con la construcción pYES2.1-hClC-2-V5-His-TOPO. A) Se señalan los sitios de corte para las enzimas de restricción *Scal y Not*l. Se muestra el promotor T7, la señal de polihistidina C-terminal (6xHis) y la señal de paro de la transcripción. La construcción es de 8583 pb. B) En los carriles 1 y 2 se observan tres fragmentos de DNA con los pesos esperados para una dirección adecuada de ligación del inserto hClC-2 (arriba mencionado).

#### TRANSFORMACIÓN DE LAS CLONAS RGY 30 Y RGY 192 DE S. cerevisiae.

Se incluyeron tres ensayos de transformaciones independientes de levaduras litiocompetentes de las clonas RGY 192 ( $gef1^{-}$ ) y RGY 30 (wt) con los plásmidos pYES2.1\_hClC-1\_V5-His-TOPO (30-hClC1 y 192-hClC1), pYES2.1\_hClC-2\_V5-His-TOPO (30-hClC2 y 192-hClC2) y pYES2.1/V5-His-TOPO como control (30-pYES y 192-pYES). Se analizaron las colonias transformadas comparándose con las clonas  $gef1^{-}$  y wt cultivadas en medio enriquecido y medio SC-U tanto sólido como líquido. Se aplicó el estadístico mencionado en material y métodos con el que se estableció la reversión del fenotipo *petite* de la clona  $gef1^{-}$  con la inserción del DNA que codifica para hClC-1 y hClC-2.

1. REVERSIÓN DEL FENOTIPO PETITE DE LA CLONA *gef1<sup>-</sup>* CON LA EXPRESIÓN DE hCIC-1 Y hCIC-2.

Greene *et al*, 1993 definen la reversión del fenotipo *petite* en base al tamaño de las colonias de clonas transformadas con CICs homólogos. En el presente estudio se determinó la reversión de dicho fenotipo tanto por el tamaño de la colonia como por el diámetro celular. De tal forma que se establece la reversión del fenotipo *petite* de la clona *gef1<sup>-</sup>* al expresarse hCIC-1 o hCIC-2 (figuras 8-11).



Figura 8. Reversión del fenotipo *petite* de la cepa RGY 192. Se muestra una imagen por microscopía estereoscópica de las cepas recombinantes a las 36 horas de cultivo en medio sólido SC-U más galactosa y ferrocina. Las colonias de las cepas RGY 192 (petite) y RGY 30 (wt) conservan su fenotipo característico bajo la transformación con el vector pYES2.1. Cuando las proteínas hClC-1 y hClC-2 son expresadas, el fenotipo de la cepa RGY 192 deja de ser *petite*; en el caso de la cepa RGY 30, el fenotipo se conserva.



Figura 9. Imagen por microscopía óptica (20X), se observan colonias aisladas de las cepas recombinantes a las 24 horas de cultivo en medio sólido SC-U más galactosa y ferrocina. Las colonias de las cepas RGY 192 y RGY 30 transformadas con el vector pYES2.1 conservan su fenotipo característico. Al ser expresadas las proteínas hCIC-1 y hCIC-2 el fenotipo de la cepa RGY 192 deja de ser *petite*, y el de la cepa RGY 30 se conserva.

El análisis a nivel microscópico arrojó resultados directamente relacionados con lo hallado a nivel macroscópico. El fenotipo *petite* de la cepa RGY 192-pYES muestra un diámetro celular menor (una micra por abajo) en comparación con el diámetro de la cepa RGY 30-pYES. Ahora bien, al ser expresados hClC-1 y hClC-2 en la cepa RGY 192 el fenotipo se revirtió, es decir, el diámetro aumento hasta ser similar al de la cepa RGY 30. Por otro lado, el diámetro de las cepas RGY 30 que expresan hClC-1 o hClC-2 permanece constante, no aumenta ni disminuye. Estos resultados son observados en cultivos de medio líquido SC-U y enriquecido, ambos con galactosa y ferrocina (figura 10 y 11).



Figura 10. Análisis microscópico de las clonas cultivadas en Medio SC-U más galactosa y ferrocina. a) Imágenes por microscopía óptica (100X) de cada una de las clonas analizadas. Las cepas RGY 192 que expresan hClC1 o hClC2 tienen un diámetro celular mayor en comparación con la cepa RGY 192-pYES que no expresa estas proteínas. Esto no sucede con las cepas RGY 30, las cuales muestran un diámetro celular similar a la cepa RGY 30-pYES. b) Medias muestrales (**en micras**) de los diámetros celulares, cada muestra con una n=100. Se observan diferencias significativas entre el diámetro de las cepas RGY 192 que expresan hClC-1 o hClC-2 y la que no lo hace. Las cepas RGY 30 no muestran diferencias significativas en cuanto su diámetro celular aún expresando dichas proteínas. Estos resultados se obtuvieron mediante ANOVA de una vía y confirmados con la prueba de Tukey para muestras de tamaño igual, con un nivel de significancia al 0.05. c) Tabla de valores con las medias de cada una de las tres muestras independientes, además de la media grupal.



Figura 11. Análisis microscópico de las clonas cultivadas en Medio Enriquecido más galactosa y ferrocina. a) Imágenes por microscopía óptica (100X) de cada una de las clonas analizadas. Las cepas RGY 192 que expresan hCIC1 o hCIC2 tienen un diámetro celular mayor en comparación con la cepa RGY 192-pYES que no expresa estas proteínas. Esto no sucede con las cepas RGY 30, las cuales muestran un diámetro celular similar a la silvestre. b) Medias muestrales (**en micras**) de los diámetros celulares, cada muestra con una n=100. Se observan diferencias significativas entre el diámetro de las cepas RGY 192 que expresan hCIC-1 o hCIC-2 y la que no lo hace. Las cepas RGY 30 no muestran diferencias significativas en cuanto su diámetro celular aún expresando dichas proteínas. Estos resultados se obtuvieron mediante ANOVA de una vía y confirmados con la prueba de Tukey para muestras de tamaño igual, con un nivel de significancia al 0.05. c) Tabla de valores con las medias de cada una de las tres muestras independientes, además de la media grupal.

El análisis estadístico confirma que la reversión del fenotipo *petite* de las levaduras *gef1*<sup>-</sup> es revertido completamente con la expresión de las proteínas hClC-1 o hClC-2. Este comportamiento es altamente parecido o igual, independientemente del medio de cultivo en el que se propague cada cepa recombinante.

Para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre las medias muestrales de las cepas cultivadas en los medios mencionados, se realizó un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia de 0.05, con la que se demuestra que **si** existen diferencias significativas entre las medias muestrales. Se realizó una prueba confirmatoria *post hoc* para muestras de igual tamaño, con la que se confirmó una diferencia estadística significativa entre las cepas RGY 192 que expresan hCIC-1 o hCIC-2 y la que no lo hace, con un nivel de significancia de 0.05.

Con estos datos se puede sugerir que el fenotipo *petite* de las levaduras mutantes *gef1<sup>-</sup>* observado en medios de crecimiento con fuentes de carbono no fermentable y restricción de hierro, puede ser revertido con la expresión de hCIC-1 o hCIC-2.

Cabe mencionar que la reversión del fenotipo desaparecía en experimentos de resiembras sucesivas, en donde las cepas no eran sujetas a presión selectiva con el fin de inducirlas a perder el plásmido. Con esto logramos observar una reversión de las cepas recombinantes hacia *petite* en la cuarta resiembra.

#### CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE O2.

Greene *et al.* 1993 reportó que la deleción del gen GEF1 causaba un pequeño cambio en el proceso de respiración mitocondrial, el cual era expresado por las levaduras como una disminución del 50% en el rango de consumo de  $O_2$  comparado con las levaduras silvestres, esto en medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentables, tales como glicerol o etanol.

En la figura 12 se muestra el consumo de  $O_2$  de las clonas en estudio en tres ensayos independientes. Se observa una clara recuperación del consumo de  $O_2$  en la mutante *gef1<sup>-</sup>* (RGY 192) al expresar hClC-1 o hClC-2.

GENOTIPO	CONSUMO DE O <sub>2</sub> (nAO <sub>2</sub> /min/10 <sup>6</sup> células)
RGY 192-pYES	3.048 ± 0.101
RGY 192-hClC1	3.625 ± 0.052
RGY 192-hClC2	3.596 ± 0.058
RGY 30-pYES	$3.658 \pm 0.068$
RGY 30-hClC1	3.609 ± 0.086
RGY 30-hClC2	3.626 ± 0.063

Figura 12. Efectos de la expresión de hClC-1 y hClC-2 en la actividad respiratoria de las cepas recombinantes. Las condiciones del cultivo ya han sido descritas.

## DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS hCIC-1 y hCIC-2.

La inmnodetección de estas proteínas por ensayos de Western blot (Ausubel et al., 1994; Sambrook y Russell, 2001) no se concretó, se utilizaron métodos diferentes para la extracción cruda de proteínas (Bollag *et al.*, 1996; Kushrinov; 2000) lográndose optimizar dicho procedimiento; sin embargo la detección de los CICs no ha sido posible. Se intentaron diversos protocolos para incrementar la resolución, incluyendo el aumento en las concentraciones de anticuerpos y el tiempo de exposición (a 4°C por 12 horas) sin resultados favorables. Constantemente se obtuvo la inmunodetección de la proteína LacZ-His, lo que muestra que el anticuerpo reconoce el epítope eficientemente (figura 13).



Figura 13. Inmunodetección de hCIC-1 y hCIC-2. La extracción de proteínas se basó en el método rápido de Kushrinov VV (2000), el ensayo se realizó en gel SDS al 7%. Solo se detectó el control positivo y otros inespecíficos, pero no hCIC-1 o hCIC-2.

Tomando en cuenta los resultados, se propuso una alternativa para determinar de forma indirecta la expresión de los hCICs, y esto fue a través de la detección de los tanscritos por RT-PCR.

## DETERMINACIÓN DEL TRANSCRITO DE hCIC-1 y hCIC-2.

Pudimos determinar los transcritos para las proteínas hClC-1 y hClC-2 mediante RT-PCR (Sambrook y Russell, 2001). Se utilizó RNA total con concentraciones aproximadas a 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, la integridad de las muestras se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (figura 14a). Se amplificaron fragmentos de los extremos 3' de la secuencia de nucleótidos codificante para tales proteínas mediante el uso de iniciadores específicos, los controles negativos están exentos de retrotranscriptasa (figura 14b).



Figura 14. RT-PCR. a) Se muestra el RNA total de las levaduras recombinantes de la cepa RGY 192 inducidas con galactosa para la expresión de hClC-1 y hClC-2. b) Amplificación de los fragmentos de hClC-1 y hClC-2 (carriles 1 y 3), 414 pb y 695 pb respectivamente. Controles negativos en los carriles 2 y 4.

# CONCLUSIONES

- 1. La expresión de hClC-1 y hClC-2 revierten el fenotipo de las levaduras mutantes *gef1<sup>-</sup>* tanto en el tamaño de la colonia como en el celular.
- 2. El consumo de O<sub>2</sub> de las cepas recombinantes es equiparable al consumo de las silvestres.

#### PERSPECTIVAS

La levadura *S. cerevisiae* puede ser un buen modelo para el estudio de los CICs, de las patologías relacionadas con mutaciones de las proteínas hCIC-1 y hCIC-2, y para la búsqueda de compuestos que bloqueen la actividad del canal. Ahora que podemos observar el impacto de la actividad de los CIC humanos en levaduras aisladas, se tiene la posibilidad de probar bloqueadores de CIC específicos para cada proteína. Experimentos preliminares en levaduras silvestres mostraron que bloqueadores de los CICs inducen el fenotipo *petite* (López-Rodríguez, en proceso). Determinar la expresión de hCIC-1 y hCIC-2 en *S. cerevisiae* y en ovocitos, apoyarían nuestros datos de complementación funcional y fortalecerían el modelo experimental propuesto.

# BIBLIOGRAFÍA

- 1. Accardi A y Miller C. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl<sup>-</sup> channels. Nature. 427: 803-807
- Accardi A, Lobet S, Williams C, Miller C y Dutzler R. 2006. Synergism between halide binding and proton transport in CLC-type exchanger. Journal of Molecular Biology. 362: 691-699
- 3. Aidley DJ y Stanfield PR. 1996. Ion channels: molecules in action. Cambridge University Press (Eds). Ions on the move (pp. 9- 23), Great Britain: Cambridge
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. 2004. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega. Organización interna de la Célula. (pp.583-1064), España: Barcelona
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ y Gaber RF. 1992. Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89: 3736-3740
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- Becker PE. 1957. Zur Frage der Heterogenie der erblichen Myotonien. Nervenarzt. 28: 455-460
- Bertl A, Anderson JA, Slayman CL y Gaber RF. 1994. Use of Saccharomyces cerevisiae for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of Katl, an inward-rectifying K+ channel from Arabidopsis thaliana, and comparison with endogeneous yeast channels and carriers. Proccedings of the National Academy of Sciences. 92: 2701-2705
- 9. Bezanilla F. 2005. Voltaje-Gated Ion Channels. IEEE Transactions on Nanobioscience. 4: 34-48
- 10. Birnboim HC. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods in Enzymology. 100: 243-255
- Blös MR, Stein V, Hübner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF y Jentsch TJ. 2001. Male germ cells and photoreceptors, both dependent in close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel

disruption. The European Molecular Biology Organization Journal. 20: 1289-1299

- 12. Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ. 1996. Protein Methods. Wiley-Liss (Eds). Neu York: USA
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254
- Burke D, Dawson D y Stearns T. 2000. Methods in Yeast Genetics, a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: USA
- 15. Chen TY. 1998. Extracellular zinc ion inhibits CIC-0 chloride channels by facilitating slow gating. The Journal of General Physiology. 112: 715-726
- Chen TY. 2005. Structure and function of CLC channels. Annual Review of Physiology. 67: 16.1-16.31
- Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocynate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry. 162: 156-159
- Conte CD, De Luca A, Mamrini M y Vrbova G. 1989. Membrane ionic conductances in normal and denervated skeletal muscle of the rat during development. Pflugers Arch: European Journal of Physiology. 413: 568–570
- Corry B y Chen S-H. 2006. Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels. Cellular and Molecular Life Sciences. 63: 301-315
- Davis-Kaplan S, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D y Kaplan J. 1998. Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: An unexpected role for intracellular chloride channels. Proccedings of the National Academy of Sciences. 95: 13641-13645
- Doley DA, Cabral JM, Pfuetzer RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT y MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. Science 280: 69-77
- 22. Dutzler R, Campbell EB y MacKinnon R. 2003. Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. Science 300: 108-112
- 23. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT y Mac-Kinnon R. 2002. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. Nature 415: 287-294
- 24. Dutzler R. 2004. Structural basis for ion conduction and gating in CIC chloride channels. Federation of European Biochemical Societies. 564: 229-233
- Eide DJ, Bridgham JT, Zhao Z y matón JR. 1993. The vacuolar H(+)-ATPase of Saccharomyces cerevisiae is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. Molecular General Genetics. 241: 447-456
- 26. Fahlke C, Yu HT, Beck CL, Rhodes TH y George AL. 1997. Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels. Nature. 390: 529-532
- Flis K, Hinzpeter A, Edelman A y Kurlandzka A. 2005. The function of mammalian CLC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. Biochemical Journal. 390: 655-664
- 28. Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD y Fink GR. 1998. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95: 4046-4050
- 29. Gietz DR, Schiestls R, Willems AR y Woods R. 1995. Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. Yeast. 11: 355-360
- Ginger E, Barnum SM y Ptashne M. 1985. Specific DNA Binding of GAL4, Positive Regulatory Protein of Yeast. Cell 40: 767-774
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H y Oliver SG. 1996. Life with 6000 Genes. Science. 274: 546-567
- 32. Gouaux E y MacKinnon R. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. Getting across the membrane. Science. 310: 1461-1465
- 33. Greene JR, Brown NH, DiDomenico BJ, Kaplan J y Eide DJ. 1993. The GEF1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an integral membrane protein; mutations which have effects on respiration and iron-limited growth. Molecular of General Genetics 241: 542-553
- Gründer S, Thiemann A, Pusch M y Jentsch TJ. 1992. Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. Nature. 360: 759–762

- Guggino WB. 1994. Chloride Channels: current topics in membranes. Academic Press (Eds). Voltage-Gated chloride channels (pp. 35-57), United Kingdom: London
- Gunther W, Piwon N and Jentsh TJ. 2003. The CLC-5 chloride channel knock out mouse- an animal model for Dent's disease. Pflugers Arch: European Journal of Physiology 445: 456-462
- Gurnett CA, Kahl SD, Anderson RD y Campbell KP. 1995. Absence of the skeletal muscle sarcolemma chloride channel CIC-1 in myotonic mice. The Journal of Biological Chemistry. 270: 9035–9038
- Hames BD. 1981. In Gel Electrophoretic of Proteins. A practical Approach. IRL Press Limited. London: England
- Haug K, Warnstedt M, Alekov KA, Sander T, Ramirez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Muller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H y Heils A. 2003. Mutation in CICN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. Nature Genetics. 33: 527-532
- 40. Haug, K. et al. (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. Nature Genetics.
  33: 527–532
- Hebeisen S, Biela A, Giese B, Müller-Newen G, Hidalgo P y Fahlk C. 2004. The Role of the Carboxyl Terminus in CIC Chloride Channel Function. The Journal of Biological Chemistry. 279: 13140–13147
- 42. Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W, Frommer W, Jentsch TJ y Steinmeyer K. 1996. The Journal of Biological Chemistry. 271: 33632–33638
- 43. Hernandez-Muñoz R, Díaz-Muñoz V, Chagoya de Sánchez V. 1992. Efects of adensine administration on the function and membrana composition of liver mithocondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 294: 160-167
- 44. Hladky SB y Haydon DA. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin a.I. Studies of the unit conductance channel. Biochimica et Biophysica Acta 274: 294-312

- 45. Hodgkin AL y Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction an excitation in nerve. The Journal of Physiology. 117: 500-544
- Huang ME, Chuat JC y Galibert F. 1994. A voltage-gated chloride channel in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of Molecular Biology. 242: 595-598
- 47. Jacobson C y Karrsnas P. 1990. Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. Electrophoresis. 11: 46-52
- 48. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F y Zdebik AA. 2002. Molecular structure and physiological function of Chloride channels. Physiological Reviews. 82: 503-506
- Jentsch TJ, Steinmeyer K y Schwartz G. 1990. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. Nature. 348: 510-514
- 50. Jentsh TJ, FriedrichT, Schriever A y Yamada H. 1999. The CLC Chloride channel family. Pflugers Arch: European Journal of Physiology. 437: 783-795
- 51. Jordan PC. 2005. Fifty Years of Progress in Ion Channels Research. IEEE Transactions on Nanobioscience. 4: 3-9
- 52. Jordt SE y Jentsch TJ. 1997. Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. The European Molecular Biology Organization Journal. 16: 1582–1592
- Kandel ER, Schuartz JH y Jessell TM. 2001. Principios de Neurociencia. McGraw Hill-Interamericana (Eds). Canales iónicos. (pp. 105-123), España: Madrid
- 54. Kida Y, Uchida S, Miyazaki H, Sasaki S y Marumo F. 2001. Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. Histochemestry and Cell Biology. 115: 189-194
- 55. Kida Y, Uchida S, Miyazaki H, Sasaki S y Marumo F. 2001. Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. Histochemestry and Cell Biology.115: 189-194
- Kirk KL. 1991a. Biochemistry of the elemental halogens and organic halides. In "Biochemistry of the Elements" (E. Frieden, Ed.), Vol. 9a. Plenum Press, New York
- Kirk KL. 1991b. Biochemistry of the halogenated organic compounds. In "Biochemistry of the Elements" (E. Frieden, Ed.), Vol. 9b. Plenum Press, New York

- Klocke R, Steinmeyer K, Jentsch TJ y Jockusch H. 1994. Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel CIC-1. A study on normal and myotonic muscle. Journal of Biological Chemistry. 269: 27635–27639
- 59. Koch CM, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Soy B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH y Jentsch TJ. 1992. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. Science. 257: 797-800
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G y Jentsch TJ. 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. Cell. 104: 205–215
- Kushnirov VV. 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. Yeast. 16: 857-860
- 62. Lehmann HF y Jurkat RK. 1999. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. Physiological Reviews. 79: 1317-1372
- Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwapach B, Scheinmam SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW y Thakker RV. 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. Nature. 379: 445-449
- 64. Lobet S y Dutzler R. 2006. Ion-binding properties of the CIC chloride selectivity filter. The European Molecular Biology Organization Journal. 25: 24-33
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D y Darnell J. 2002. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana (Eds). Propiedades moleculares de los canales iónicos regulados por voltaje. (pp. 927-935). España: Madrid
- Lorenz C, Pusch M y Jentsch TJ. 1996. Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93: 13362–13366
- 67. Ludewing U, Pusch M y Jentsch TJ. 1996. Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. Nature. 383: 340–343
- 68. Ludewing U, Pusch M y Jentsch. 1997. Independent gating of single pores in CLC-0 chloride channels. Biophysical Journal. 73: 789-797
- Maduke L, Miller C y Mindell JA. 2000. A Decade of CLC chloride channels: structure, mechanism and many unsettled questions. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 29: 411-438

- Maduke M, Pheasant DJ y Miller C. 1999. High-level expression, functional reconstitution, and quaternary structure of a prokaryotic CIC chloride channel. Journal of General Physiology. 114: 713-722
- Maduke M, Williams C y Miller C. 1998. Formation of CLC-0 chloride channels from separated transmembrane and cytoplasmic domains. Biochemistry. 37: 1315-1321
- 72. Meyer S y Dutzler R. 2006. Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Chloride Channel CIC-0. Structure. 14: 299-307
- 73. Middleton RE, Pheasant DJ y Miller C. 1996. Homodimeric architecture of a CIC- type chloride ion channel. Nature 383: 337-340
- 74. Miller C y White MM. 1980. A voltage dependent chloride conductance channel from Torpedo electroplax membrane. Annals of the New York Academy of Sciences. 341: 534-551
- Miller C y White MM. 1984. Dimeric structure of single chloride channels fron Torpedo electropolar. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81: 2271-2253
- 76. Mindell JA, Maduke M, Miller C y Grigorieff N. 2001. Projection structure of a CIC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. Nature. 409: 219-223
- 77. Miyazaki H, Uchida S, Takei Y, Hirano T, Marumo F y Sasaki S. 1999. Molecular Cloning of CLC Chloride Channels in Oreochromis Mossambicus and Their Functional Complementation of Yeast CLC Gene Mutant. Biochemical and Biophysical Research Communications. 255: 175–181
- Nilius B y Droogmans G. 2003. Amazing Chloride channels: an overview. Acta Physiologica Scandinavica. 117: 119-147
- 79. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyati T y Numa S. 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature. 312: 121-127
- O'Neill GP, Grygorczy RAdam M y Ford-Hutchinson AW. 1991. The nucleotide sequence of a voltage-gate chloride channel from the electric organ of *Tropedo califirnica*. Biochimica et Biophysica Acta. 1129: 131-134

- 81. Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN y Jan LY. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. Science. 237: 749-753
- Ponting CP. 1997. CBS domains in CIC chloride channels implicated in myotonia and nephrolithiasis (kidney stones). Journal of Molecular Medicine. 75: 160–163
- 83. Pusch M y Jentsch TJ. 2005. Unique Structure and Function of Chloride Transporting CLC Proteins. IEEE Transactions on Nanobioscience. 4: 49-57
- Richkov GY, Pusch M, Astill D, Roberts ML, Jentsch TJ y Bretag AH. 1956.
   Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel CIC-1. Juornal of Physiology. 497.2: 423-435
- 85. Rosenfeld E y Beauvoit B. 2003. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 20: 1115-1144
- Rossow CF, Duan D, Hatton WJ, Britton F, Hume JR y Horowits B. 2006.
   Functional role of amino terminus in CIC-3 chloride channel regulation by phosphorylation and cell volume. Acta Physiologica. 187: 5-19
- Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ y Bretag AH. 1998. Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, ClC-1, by foreign anions. The Journal of General Physiology. 111: 653–665
- Saimi Y, Martinac B, Gustin MC, Culbertson MR, Adler J y Kung C. 1988. Ión channels in Paramecium, yeast, and *Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences. 13 (8): 304-309
- 89. Sambrook J y Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sardini A, Ameya JS, Weylandt K-H, Nobles M, Valverde MA, Higgins CF. 2003.
   Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. Biochimica et Biophysica Acta. 1618: 153-162
- 91. Schatz G. 1979. Biogenesis of yeast mitochondria: synthesis of cytochrome c oxidase and cytochrome c. Methods in Enzymology. 56: 40-50
- 92. Scheffer IE y Berkovic SF. 2003. The genetics of human epilepsy. TRENDS in Pharmacological Sciences. 24: 428-433
- 93. Schmidt RT y Jentsch TJ. 1997. Transmembran topology of a CLC chloride channel. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94: 7633-7638

- 94. Schmidt-Rose T y Jentsh TJ. 1997. Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. The Journal of Biological Chemistry. 272: 20515-20521
- 95. Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K y Jentsh TJ. 1998. Golgi localization and functionally important domains in the NH<sub>2</sub> and COOH terminus of the yeast CLC putative Chloride Channel Gef1p. The Journal of Biological Chemistry. 273: 15110-15118
- Sherman F. 1962. Respiration-deficient mutants of yeast. I: Genetics. Genetics.
   375-385
- 97. Sherman F. 1998. The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Meyers RA (Eds). An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae. (pp. 302-325), Germany: Weinheim
- Shuman S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. The Journal of Biological Chemistry. 269: 32678-32684
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodríguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachitman H, Griswold W, Richard GA, John E y Lifton RP. 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. Nature Genetics. 17: 171–178
- 100. Skin A, Smith RL y Freund TF. 2000. Distribution of chloride channel-2immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience*. 101: 51–65
- 101. Steinmeyer K, Ortland C y Jebtsch TJ. 1991. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. Nature 354: 301-304
- 102. Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bosl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R y Jentsh TJ. 2001. Disrruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. Neuron. 29: 185-196
- 103. Sumikawa K, Parker I y Miledi R. 1984. Separate fractions of mRNA from Torpedo electric organ induce chloride channels and acetylcholine receptors in

Xenopus oocytes. The European Molecular Biology Organization Journal. 3: 2291-2294

- 104. Templeton DM. 2002. Molecular and Cellular Iron Transport. Marcel Dekker (Eds). Iron Uptake in Yeast. (pp. 375-393), New York : USA
- 105. Thiemann A, Gründer S, Pusch M y Jentsch TJ. 1992. A Chloride channel widely expressed in epithelial and nonepithelial cells. Nature. 356: 57-60
- 106. Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680.
- 107. Thomsen J. 1876. Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer Disposition. Arch Psychatrie Nerv. 6: 702-718
- 108. Tzagoloff A y Dieckmann CL. 1990. PET genes of Saccharomyces cerevisiae. Microbiological Reviews. 54: 211-225
- 109. Valverde RC, Orozco A, Becerra A, Jeziorski MC, Villalobos P y Solís SC. 2004.
   Halometabolites y Celular Dehalogenase Systems: An Evolutionary Perspective.
   Internal Review of Cytology. 234: 143-191
- 110. Wachter A y Scwappach B. 2005. The yeast CLC chloride channel is proteolytically processed by the furin-like protease Kex2p in the first extracellular loop. Federation of European Biochemical Societies Letters. 579: 1149-1153
- 111. Weinreich F y Jentsch TJ. 2001. Pores Formed by Single Subunits in Mixed Dimers of Different CLC Chloride Channels. The Journal of Biological Chemistry. 276: 2347–2353
- 112. West RWJ, Yocum RR y Ptashne M. 1984. Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region: Location of the Upstream Activator Secuence UAS<sub>G</sub>. Molecular and Cellular Biology. 4: 2467-2478
- 113. Wolfe DM y Pearce DA. 2006. Channeling Studies in Yeast: yeast as a model for channelopathies? NeuroMolecular Medicine. 8: 279-306
- 114. Wollnik B, Kubisch C, Steinmeyer K, Pusch M. 1997. Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CIC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. Human Molecular Genetics. 6: 805-811
- 115. Zar JH. 1999. Biostatistical analisis. Prentice-Hall (Eds). Multisample Hypotesis: The Analysis of Variance. (pp. 177-207), USA: New Jersey

# APÉNDICES

# **APÉNDICE A**

## Preparación de medios de cultivo.

## Medio SOC

Para 100 mL se mezclaron: 97 mL de agua bidestilada estéril, 2 g de Bacto-triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1M y 0.25 mL de KCl 1M, se agito a temperatura ambiente por 10 minutos y se esterilizo en autoclave por 20 minutos a 120 °C. Una vez frío se agregó 1 mL de Mg<sup>++</sup> 2M y 1 mL de dextrosa. Se esterilizó por filtración.

## <u>Medio LB</u>

Para cada litro de cultivo se agregaron: 10 g de Bacto-triptona, 5 g extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de sodio y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120 °C. Se agregó 1 mL de ampicilina (50 mg/mL) a una temperatura igual o menor a 50 °C.

#### Medio LB agar

Para cada litro de cultivo se agregaron: 10 g de Bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl y 15 g de agar. Se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de sodio y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120 °C. Se agregó 1 mL de ampicilina (50 mg/mL) a una temperatura igual o menor a 50 °C

Una vez agregado el antibiótico, se vertieron 15 mL de medio en cajas de poliestireno de 100 x 15 mm y se dejo polimerizar por 15 minutos bajo campana de flujo laminar.

## Medio SC (sintético completo)

Para cada litro de medio de agregaron: 6.7 g de YNB, 0.1 g de Leucina, 0.1 g de Triptofano y 0.05 g de Histidina. Se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C. Se deja enfriar 50°C o menos y se agregaron 20 g de galactosa, 20 mL Etanol, 20 mL de glicerol y 0.4925 g de ferrocina [1 mM final].

Si se prepara **medio sólido**, se agrega el 2% de agar (Bruke et al., 2000; pYES2.1 TOPO manual, Invitrogen).

## Medio YPD

Por cada litro se agregó: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa. Se afora con agua destilada y se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 120°C.

# **APÉNDICE B**

# Preparación de soluciones

## <u>Ampicilina</u>

Para una concentración de 50 mg/mL, se mezclaron 50 mg de ampicilina y se aforo a 1 mL con agua bidestilada estéril. Se esterilizó por filtración y almaceno a -20 °C.

## Solución de lisis celular

Para cada 50 mL de solución se agregaron: 25 mL de fosfato de sodio 100 mM pH 7.4, 50  $\mu$ L de EDTA 1 M, 2.5 mL de glicerol [100%], 250  $\mu$ L de PMSF 200 mM y 22 mL de agua destilada estéril. Se esteriliza por filtración y ce almacena a temperatura ambiente.

## Fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4

Antes de iniciar, se deben tener las siguientes soluciones:

- Para 100 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 1 M, se disuelven 13.8 g de este último en 90 mL de agua destilada estéril. La mezcla es aforada a 100 mL con la misma agua. Se esteriliza por filtración.
- Para 100 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 1 M, se disuelven 26.81 g de este último en 90 mL de agua destilada estéril. La mezcla es aforada a 100 mL con la misma agua. Se esteriliza por filtración.

Por cada litro de <u>Fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4</u> se mezclaron 22.6 mL de  $NaH_2PO_4H_2O$  1 M y 77.4 mL de  $Na_2HPO_47H_2O$  1 M, se aforó a 1 L con agua destilada estéril y se esterilizó por filtración.

# Ácido etilendinitrilo tetracético (EDTA) 1 M

Para cada litro de solución se agregaron 372.24 g de EDTA y se aforó con agua destilada estéril. Se esterilizó por filtración y almacenó a temperatura ambiente.

## Fenil-metil-sulfonil fluorano (PMSF) 200 mM

Para un litro de solución, se agregaron 34.838 g de PMSF, se diluyó en metanol y se aforo en agua destilada estéril. Esta solución es estable por 4 meses.

## Acrilamida/bis-acrilamida (30 % - 0.8 %)

La forma monomérica de ambas sustancias es altamente tóxica, y puede ser absorbida por la piel o por inhalación.

Para cada 100 mL se mezclaron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida, se aforó con agua destilada y se esterilizó por filtración.

#### TRIS-HCI 1.5 M pH 8.8

Para 100 mL de solución, se pesaron 18.15 g de TRIS, se aforó con agua destilada estéril y se ajustó el pH con HCl 1N. Se almacenó a 4°C.

#### TRIS-HCI 0.5 M pH 6.8

Para 100 mL de solución, se pesaron 6 g de TRIS, se aforó con agua destilada estéril y se ajustó el pH con HCl 1N. Se almacenó a 4°C.

#### <u>SDS 10%</u>

Se mezcló, en agitación suave, agua destilada estéril y 10 g de sodio duodecil sulfato (SDS), se aforó y almacenó a temperatura ambiente.

# Amortiguador de muestra 5X (10 mL)

TRIS-HCI 1M pH 6.8	0.6 mL	[60 mM]
Glicerol 50%	5.0 mL	[25%]
SDS 10%	2.0 mL	[2%]
2-β-mercaptoetanol	0.5 mL	[14.4 mM]
Azul de bromofenol 1%	1.0 mL	[0.1%]
Agua destilada estéril	0.9 mL	

Esta mezcla es estable por 6 meses a -20 °C.

# Amortiguador de corrida 5X, pH 8.3

Por cada 500 mL se agregaron: 7.5 g de TRIS, 36 g de Glicina y 2.5 g de SDS, se ajusto el pH con HCl y se aforó con agua destilada estéril. Estable por meses. Si existían precipitados, la solución se calentó a 37 grados para favorecer se disolución.

# Persulfato de amonio (1 mL)

En un tubo de polipropileno se pesó 0.1 gramos de persulfato de amonio y se aforo a 1 mL con agua destilada estéril. Su preparación debe ser inmediatamente antes de usarse.

# Tris Buffer Salino (TBS) 10X, pH 7.6

Para 100 mL de solución se mezclaron 2.42 g de Tris-HCl y 8 g de NaCl, se aforó con agua destilada estéril y se ajustó el pH con HCl.

# Solución para tinción (azul de Coomassie)

Para cada 100 mL de solución se agregó: 40 mL de metanol (40 %), 10 mL de ácido acético (10 %), 0.1 mL de azul de Coomassie R-250 (0.1 %) y se aforó a 100 mL con agua destilada estéril.

# Solución para desteñir

Por cada 100 mL de solución se agregaron: 40 mL de metanol (40 %), 10 mL de ácido acético (10 %) y se aforó a 100 mL con agua destilada estéril.

#### Solución de Bloqueo (1X TBS, 0.1% Tween-20 y 5% de leche descremada)

Para 150 mL de solución se agregaron 15 mL de TBS 10X en 135 mL de agua destilada estéril, 7.5 g de leche descremada y 0.15 mL de Tween-20 (100%). Se almacena a 4°C.