



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

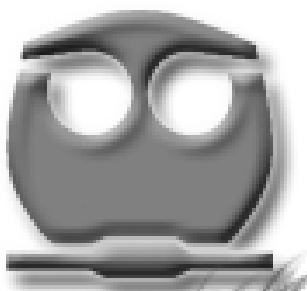
**LOCALIZACIÓN DEL CANAL DE POTASIO
GIRK5 EN LOS OVOCITOS DE LA RANA**
Xenopus laevis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BEATRIZ DÍAZ BELLO



MEXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz.
Vocal	Dra. Maria Eugenia Torres Márquez.
Secretario	Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.
1er. Suplente	Dr. Felipe Cruz García.
2º. Suplente	M. en C. Enrique Moreno Saenz.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR:

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez

SUSTENTANTE:

Beatriz Díaz Bello

A mis padres.

Agradecimientos.

A la Dra. Laura Escobar por aceptarme en su grupo de trabajo, compartir este proyecto y confiar en mí durante un momento crítico de mi orientación profesional.

A la M. en C. Carolina Salvador Hernández por su apoyo técnico, paciencia y disposición para enseñarme una parte fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Al Q.F.B. Rolando Carrisoza Gaytán por su asesoría técnica, por enseñarme la otra parte, promover mi capacidad de observación, pensamiento lógico y búsqueda de información.

Al jurado asignado por revisar esta tesis y con sus correcciones ayudarme a mejorarla: Dra. Marina Gavilanes Ruiz y Dra. María Eugenia Torres Márquez.

A la *UNAM*, por brindarme sus puertas abiertas para lograr una formación profesional e incluso personal.

A la Facultad de Química y sus profesores, por permitirme adquirir los conocimientos que comprenden esta maravillosa carrera y darme oportunidades de acercamiento a la investigación.

A la Facultad de Medicina, por las instalaciones para desarrollar este trabajo.

Esta tesis se desarrolló con ayuda del *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica* (PAPIIT) a través de la DGAPA. Proyecto no. IN224406.

Agradecimientos – II.

Quiero aprovechar esta sección para dejar plasmado mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho de algún momento de mi vida algo mejor, así que en orden de aparición:

A mis padres por educarme para ser quien soy y darme la oportunidad de cumplir con este sueño.

A mi hermana por todas las horas de desvelo, las simplezas, la música, por ser muchas veces mi ejemplo y por existir: sin ti mi vida no sería lo mismo.

A Caritina Castillo y Victoria Torres por influenciar en mí con su ejemplo más de lo que imaginan y porque aunque mi nombre nunca lo diga las llevo en mis genes.

A TODA mi familia cosanguinea y todos aquellos que son mis amigos de verdad.

A Gema O. y mis amig@s de la prepa por los mejores años de mi vida estudiantil.

A mis amigos de primer semestre en la universidad por hacer de la transición algo más llevadero.

A los que me permitieron formar parte de varias familias en el transcurso de la carrera y compartir momentos inolvidables, a los todos integrantes de 'La Familia Telerín', 'Las chochas' y 'La jardinera'.

A todos aquellos amigos de la facultad con los que pasé pequeños-grandes momentos.

A Adrián H., por ser el ingeniero que más entiende de mi mundo biologiesco, por su apoyo incondicional durante los momentos más estresantes y más ligeros de estos últimos años, y por ser parte de mi vida.

A todos lo que conforman las fuerzas básicas del laboratorio 510 de medicina, por su apoyo, sus enseñanzas, las risas, la comida y por hacer un agradable ambiente de trabajo.

Y a ese ente universal que se le suele nombrar Dios por permitirme conocer a cada una de estas personas y finalizar una etapa más.

“En la naturaleza todo es doble; todo tiene dos polos; todo su par de opuestos; los semejantes y los antagónicos son lo mismo; los opuestos son idénticos en naturaleza, pero diferentes en grado; los extremos se tocan; todas las verdades son semi verdades; todas las paradojas pueden reconciliarse.”

El Kybalión

ÍNDICE	Pág.
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 HIPÓTESIS.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	13
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Transporte de iones a través de la membrana plasmática.....	14
2.2 Canales de K ⁺	15
2.2.1 Clasificación.....	16
2.3 Canales de K ⁺ rectificadores entrantes (Kir).....	17
2.3.1 Clasificación.....	20
2.4 La Subfamilia Kir 3 (GIRK) activada por el dímero Gβγ.....	20
2.4.1. Canales GIRK en células no excitables.....	21
2.5 Un canal endógeno de los ovocitos de la rana <i>Xenopus</i> : el canal de potasio GIRK5.....	22
2.6 Localización intracelular de proteínas.....	24
2.6.1 Péptido señal y secuencias topogénicas.....	24
2.6.2 Motivos de localización intracelular.....	26
2.6.3 Motivos de localización endosomal-lisosomal y basolateral.....	28
3. METODOLOGÍA.....	31
3.1 Transcripción <i>in vitro</i> de RNA.....	32
3.2 Obtención de los ovocitos.....	32
3.3 Microinyección de los ovocitos.....	32
3.4 Réplica en Western.....	33
3.5 Microscopía confocal.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1 Transcripción <i>in vitro</i> de RNA.....	36
4.2 Réplica en Western.....	37
4.3 Microscopía confocal.....	39
4.4 Papel de los canales GIRK5 en la formación de la vesícula de rompimiento.....	48
5. CONCLUSIONES.....	52
6. PERSPECTIVAS.....	52
7. REFERENCIAS.....	53
8. APÉNDICE.....	56
8.1 Metodología.....	56
8.2 Formulación de soluciones.....	58

ABREVIATURAS

Kir	Canal de potasio rectificador entrante.
G$\beta$$\gamma$	Subunidades beta-gamma del trímero que conforma a la proteína G.
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante dependiente de proteína G$\beta$$\gamma$.
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero.
EGFP	Proteína verde de fluorescencia aumentada.
Δ25GIRK5	Isoforma del canal GIRK5 sin los primeros 25 aminoácidos.
Y16AGIRK5	Mutación puntual del residuo de tirosina 16 por alanina del canal GIRK5.
EGFP-GIRK5	Quimera del canal GIRK5 y la proteína verde fluorescente.
EGFP-Δ25GIRK5	Quimera del canal Δ25GIRK5 y la proteína verde fluorescente.
EGFP-Y16AGIRK5	Quimera del canal Y16AGIRK y la proteína verde fluorescente.
ND96	Medio de incubación de los ovocitos de la rana <i>X. laevis</i>.

RESUMEN

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de iones a través de un poro acuoso en favor de su gradiente electroquímico; son selectivos al paso de un solo ión, contribuyen a la homeostasis iónica, al control de la transmisión eléctrica y la secreción hormonal. En particular, los canales de potasio controlan el potencial de membrana en reposo y la fase de repolarización del potencial de acción en las células excitables. La familia de canales de potasio rectificadores entrantes Kir está presente en todas las células y se encuentran abiertos en condiciones de reposo. En particular, la subfamilia Kir3 o GIRK se regula por los receptores acoplados a las proteínas G (las subunidades G $\beta\gamma$ se unen a los canales). Existen 5 tipos de estos canales: GIRK1-GIRK4 en mamíferos y GIRK5 en anfibio.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* constituyen uno de los sistemas más utilizados en la expresión de los genes de diversas proteínas de membrana: transportadores, receptores y canales iónicos. Sin embargo, los ovocitos presentan algunas corrientes iónicas endógenas (Weber, 1999). En una solución con alto potasio se puede registrar ocasionalmente una corriente rectificadora entrante (Bauer *et al*, 1996). En 1996, el grupo de Clapham aisló el DNAc de una isoforma de un canal de potasio activado por proteínas G (GIRK5, subfamilia Kir3 o GIRK). De acuerdo a su secuencia de nucleótidos, el canal de potasio GIRK5 tiene tres posibles sitios de inicio, originando con ello tres posibles isoformas (Hedin *et al*, 1996). Al estudiar la funcionalidad de las isoformas se encontró que en la región del amino terminal del canal GIRK5 hay una tirosina (Y16) cuya fosforilación por una cinasa soluble mantiene al canal endocitado en los ovocitos maduros (Mora, I. y Escobar, L. 2005). A su vez, en los primeros 25 aminoácidos del NH₂-terminal se encuentra la secuencia LYESPQLIQ, la cual corresponde a un motivo de dileucina [DE]XXXL[LI] que determina la localización basolateral en células epiteliales y su tráfico hacia lisosomas (Bonifacino y Traub, 2003).

El objetivo de este trabajo fue determinar si el canal de potasio GIRK5 se encuentra localizado en uno de los polos de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

Se utilizaron construcciones quiméricas con la proteína verde fluorescente EGFP y se aplicaron técnicas de réplica en Western y de microscopía confocal. Los ovocitos se analizaron al cuarto, quinto y sexto día después de la inyección de los RNAs de los canales EGFP-GIRK5.

La localización de los canales fue: EGFP-GIRK5 en el citoplasma, EGFP- Δ 25GIRK5 en toda la membrana plasmática y en el citoplasma y, por último, EGFP-GIRK5Y16A en la membrana plasmática del polo vegetal. Esto sugiere que el motivo LI presente en la posición 21,22 en el amino terminal del canal de potasio GIRK5, determina su localización en el polo vegetal de los ovocitos.

1. INTRODUCCIÓN

De los sistemas de expresión de proteínas que hasta hoy se han desarrollado, uno de los más exitosos es el que se basa en la microinyección de DNA o RNA en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (*X. laevis*). Este sistema de expresión heteróloga utilizado por Gurdon en 1977 y posteriormente por Ricardo Miledi en 1982, permite la síntesis de proteínas de membrana plasmática exógenas (transportadores, canales iónicos, receptores).

Miledi demostró que la expresión tenía propiedades similares a las de los receptores nativos, mediante la síntesis de receptores nicotínicos de acetilcolina a partir de un RNAm extraído de células musculares de gato (Miledi, 1982).

Desde entonces los ovocitos se han utilizado para llevar a cabo múltiples ensayos para traducir RNAm de diferentes fuentes incluyendo virus, bacterias, levaduras, plantas y animales (expression cloning). Su aplicación más frecuente es la expresión de proteínas membranales, citosólicas, receptores y canales iónicos para estudios de la relación estructura/función (Vargas *et al*, 2004).

Una ventaja indiscutible de los ovocitos es la facilidad con la que se pueden manipular. Además de la cirugía de la rana, los ovocitos se obtienen en poco tiempo (4-5 h) y no necesitan mantenerse en condiciones muy elaboradas, como esterilidad absoluta o medios de cultivo caros. Este sistema ofrece un gran número de posibilidades de experimentación porque permite combinar el uso de varias técnicas en una sola célula (Weber, 1999).

Los ovocitos tratados apropiadamente: temperatura constante de 18 C y cambios diarios del medio de cultivo, pueden ser utilizados entre 10 y 15 días. Las temperaturas de incubación suelen ser entre 14 y 18° C tanto para ovocitos inyectados como para aquellos que se mantienen como controles.

Los ovocitos de *X. laevis* son un sistema de expresión heteróloga excelente para la investigación y caracterización de proteínas de transporte, a los que se les pueden aplicar técnicas electrofisiológicas como voltaje-clamp (fijación de voltaje con dos microelectrodos), patch-clamp (registro en un segmento de la membrana), medición

continua de la capacitancia, medición intracelular de iones con electrodos selectivos, etc. Otras técnicas incluyen las mediciones de corrientes de salida, corrientes de entrada, microscópicas, técnicas de video-imagen, gravimétricas y de medición de volumen (Weber, 1999).

Los ovocitos también poseen canales iónicos y receptores endógenos, a pesar de ello, las proteínas expresadas heterológamente se pueden distinguir de manera clara. Muchas veces, las corrientes producidas por canales iónicos endógenos son pequeñas, comparadas con las corrientes de los canales recombinantes. En otros casos, el perfil farmacológico de los canales exógenos es diferente al de los endógenos. Sin embargo, debido a que algunos canales forman heteromultímeros, el conocimiento de las corrientes iónicas endógenas es fundamental cuando se caracterizan canales iónicos exógenos.

Los RNA mensajeros de los canales endógenos se traducen en los ovocitos durante el proceso de ovogénesis, el cual consiste en 6 etapas que ocurren en aproximadamente 8 meses. La ovogénesis es asincrónica, lo que indica que pueden encontrarse ovocitos en todos los estadios (I-VI) en un mismo momento, sin embargo, son los del estadio V y VI los que se seleccionan para la expresión heteróloga. A lo largo de estas etapas, los ovocitos acumulan ribosomas, yema, lípidos y RNAm materno que posteriormente regula la síntesis de proteínas y el desarrollo embrional temprano. Al igual que otros vertebrados, los ovocitos de *X. laevis* están fisiológicamente detenidos la fase G2 antes de la primera profase de meiosis (Weber, 1999).

Se sabe que el dímero beta-gamma ($G\beta\gamma$) que forma parte de las proteínas G es el responsable de mantener a estos ovocitos en estado arrestado. Es interesante que también $G\beta\gamma$ es el responsable de activar al canal de potasio rectificador entrante acoplado a proteínas G, el canal GIRK5, que es un canal iónico endógeno de los ovocitos de *X. laevis* (Hedin *et al*, 1996; Clapham *et al*, 1996).

El canal GIRK5 es un homomultímero a diferencia de los canales heteromultímeros de GIRK1 con: GIRK2, GIRK3 y GIRK4 localizados en el corazón (GIRK1/GIRK4) y el cerebro (GIRK1-GIRKx) de los mamíferos. GIRK5 está formado por 4 subunidades de manera que es un homotetrámero localizado en una célula no excitable. Se ha demostrado su

expresión funcional en algunos lotes de ovocitos mientras que se encuentra ausente en otros. Esta variabilidad ha promovido el estudio de su regulación, encontrando que en la región del amino terminal de su secuencia proteica está presente en el residuo 16 una tirosina, cuya presencia es de vital importancia para la funcionalidad del canal (Mora y Escobar, 2005).

Estudios en los que se utilizaron isoformas sintéticas sin los primeros 5 y 25 residuos de aminoácidos ($\Delta 5$ -GIRK5 y $\Delta 25$ -GIRK5, respectivamente), así como la mutante de la tirosina 16 por alanina (Y16AGIRK5), demostraron que aquellas isoformas que no contienen la tirosina son funcionales ($\Delta 25$ GIRK5 y Y16AGIRK5), mientras que aquellas que poseen dicho residuo ($\Delta 5$ GIRK5 y GIRK5) no lo son. Por otra parte, también la fosforilación de la tirosina Y16 por una proteína cinasa del tipo Src es lo que evita la expresión funcional del canal en la membrana plasmática del ovocito (Mora y Escobar, 2005).

Adicionalmente, en la región del amino terminal del canal de potasio GIRK5 se encuentra la secuencia LYESPQLIQ, la cual corresponde a un motivo de dileucina [DE]XXXL[LI]. Este motivo es característico de la localización basolateral de proteínas en células epiteliales (Bonifacino y Traub, 2003). Como el ovocito de *Xenopus laevis* es radialmente simétrico y la mayoría de los RNAs maternos se distribuyen en el polo animal o en el vegetal (Kloc *et al*, 2001; King *et al*, 2005), es probable que el motivo de dileucina determine la localización del canal GIRK5 en uno de los polos. A diferencia de los RNAs maternos que sí están polarizados, (aunque no está descrito que las proteínas correspondientes lo estén también), no se ha reportado la distribución polarizada de ninguna proteína del ovocito.

1.1 HIPÓTESIS

El motivo de dileucina [DE]XXXL[LI] presente en los primeros 25 aminoácidos del amino terminal del canal de potasio GIRK5, determina la localización del canal en uno de los polos de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- * Estudiar la localización del canal de potasio GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Determinar la expresión de los canales GIRK5 en las fracciones de membrana por la técnica de réplica en Western.
- * Determinar la localización de los canales GIRK5 en las células por microscopía confocal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Transporte de iones a través de la membrana plasmática.

El transporte de iones y de pequeñas moléculas orgánicas hidrosolubles a través de la bicapa lipídica se lleva a cabo por proteínas transmembranales, cada una de las cuales permite la transferencia de una molécula, un ión específico o un grupo de moléculas afines. Los canales iónicos permiten la difusión selectiva de un tipo de ión: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- a favor de su gradiente de concentración y eléctrico (potencial electroquímico). Todas las membranas plasmáticas tienen una diferencia de potencial (potencial de membrana) en las que el interior es negativo con respecto al exterior (Alberts *et al*, 2002).

TABLA 1. Comparación de las concentraciones de iones dentro y fuera de una célula de mamífero típica.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN INTRACELULAR (mM)	CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR (mM)
Cationes		
Sodio (Na^+)	5-15	145
Potasio (K^+)	140	5
Magnesio (Mg^{2+})	0.5	1-2
Calcio (Ca^{2+})	10^{-4}	1-2
Hidrógeno (H^+)	10-7.2 o pH 7.2	10-7.4 o pH 7.4
Aniones		
Cloro (Cl^-)	5-15	110

Los iones que han de ser transportados tienen que deshacerse de todas las moléculas de agua asociadas para pasar a través de la parte más estrecha del canal, lo que se conoce como filtro de selectividad. Esta propiedad de *selectividad iónica* (explicada posteriormente) y la *regulación de su apertura* distinguen a los canales iónicos de un poro acuoso.

La apertura de los canales ocurre en respuesta a un estímulo específico. Los principales estímulos son cambios en el voltaje a través de la membrana (*canales regulados por voltaje*), un estrés mecánico (*canales regulados mecánicamente*) o la unión de un ligando (*canales regulados por ligando*). El ligando puede ser tanto un mediador extracelular (*canales regulados por neurotransmisor*) o un mediador intracelular, o un nucleótido (*canales regulados por nucleótidos*). Además, la actividad de muchos canales iónicos está regulada por fosforilación y defosforilación (Alberts *et al*, 2002).

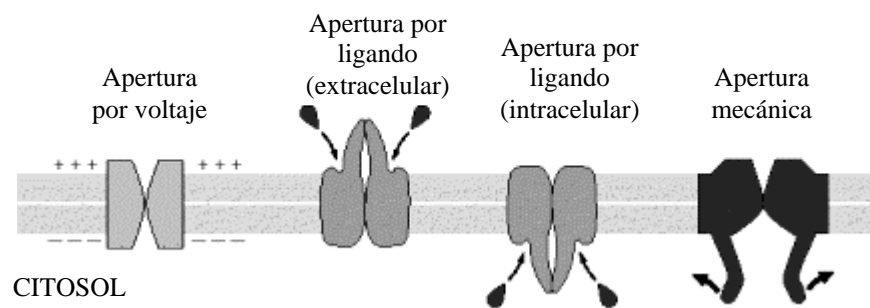


FIGURA 1. Estímulos que regulan la apertura de canales iónicos (Alberts, 2004).

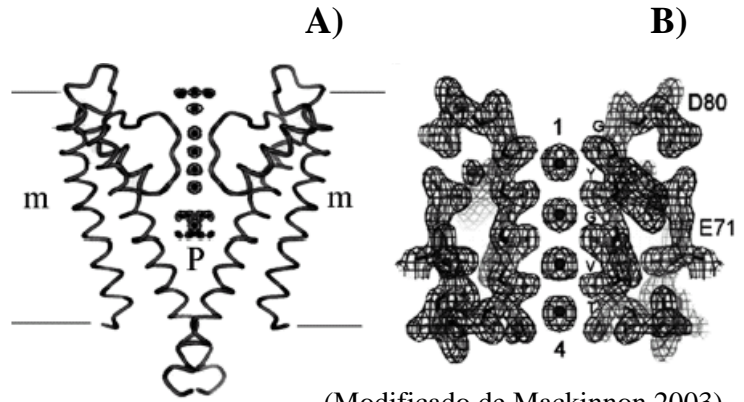
2.2 Canales de K^+ .

Quizá los canales iónicos más comunes son los que permiten el tránsito de K^+ , juegan un papel crucial para el mantenimiento del potencial de membrana en reposo de todas las membranas plasmáticas y en controlar la fase de repolarización en las células excitables. El potencial de la membrana en reposo es muy cercano al potencial de equilibrio para el ión K^+ debido a que los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir) están abiertos (Alberts *et al*, 2002).

Los canales de potasio comprenden cuatro subunidades que contienen una región altamente conservada que forma el poro central que atraviesa la membrana. En la entrada citosólica del poro se concentran aminoácidos cargados negativamente, que atraen cationes y repelen aniones, lo que contribuye a que el canal sea selectivo para cationes. Dentro del poro hay una secuencia de aminoácidos (TVGYG) altamente conservada que se denomina el filtro de selectividad y favorece el paso de los iones K^+ sobre los del Na^+ (Ruppertsberg *et al* 2000, Heginbotham y Mackinnon 1992).

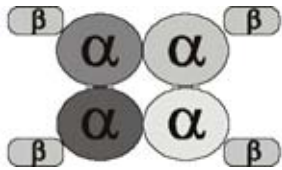
La estructura del filtro explica la gran selectividad iónica del canal. Para que un ión K^+ pueda entrar en el filtro, tiene que perder casi todas las moléculas de agua que tiene unidas e interactuar con los oxígenos de los grupos carbonilo que se alinean a lo largo del filtro de selectividad, espaciados rígidamente a una distancia exacta que permite acomodar al ión K^+ . Por el contrario, el ión Na^+ no puede entrar en el filtro porque los oxígenos carbonilo están demasiado alejados del Na^+ , que es más pequeño que el K^+ , para compensar el gasto energético asociado a la pérdida de las moléculas de agua que se requiere para entrar en el canal (Alberts *et al*, 2002)

FIGURA 2. Filtro de selectividad A) Dos de las cuatro subunidades de un canal de potasio. Las hélices internas son las que están en estrecha relación con la región del poro (P) y las hélices externas se encuentran embebidas en la membrana (m). El filtro de selectividad se localiza en la región central y está unido a una pequeña α -hélice. B) Región del filtro de selectividad con cuatro iones K^+ rodeados de agua.



(Modificado de Mackinnon 2003)

2.2.1 Clasificación.



Los canales de potasio se encuentran compuestos de subunidades alfa (α) y en algunos casos, de subunidades beta (β). La subunidad α es la responsable de la conducción iónica, atraviesa la bicapa lipídica y contiene la región del poro con su filtro de selectividad. La subunidad β modula algunas propiedades biofísicas de los canales como la cinética de corriente, la probabilidad de apertura y puede modular la expresión de las subunidades α en la membrana (Heginbotham y Mackinnon, 1992, Biggin *et al*, 2000).

FIGURA 3. Subunidades α y β de un canal de K^+ .

Dependiendo de la subunidad α y de su topología existen canales de potasio con dos, cuatro, seis, siete y ocho segmentos transmembrana (TM); sus características se describen en la tabla 1.

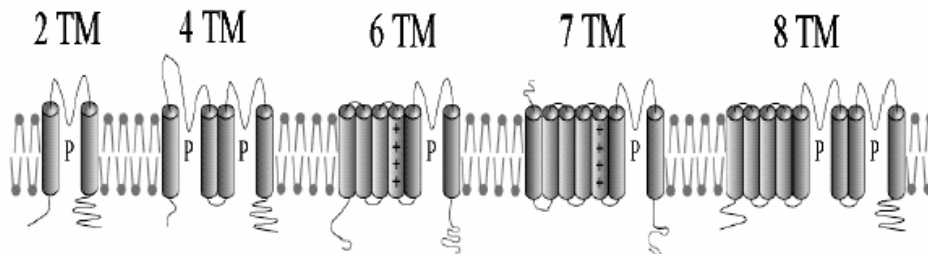
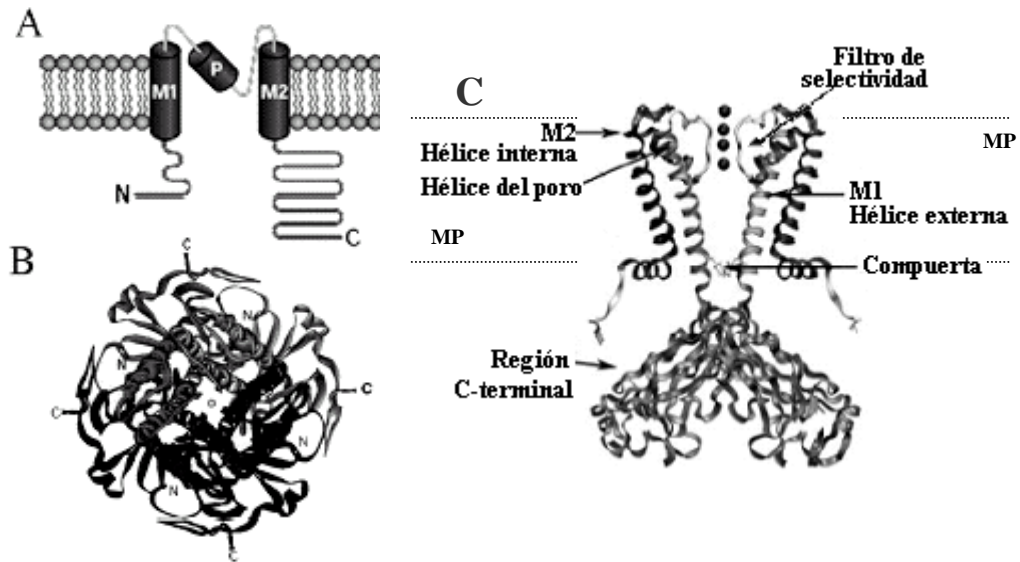


TABLA 1. Clasificación de los canales de potasio de acuerdo al número de segmentos transmembranales de la subunidad α .

SEGMENTOS TM (ARREGLO OLIGOMÉRICO)	TIPO DE CANAL	NOMBRES	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Dos (Tetrámeros)	Rectificador entrante.	Kir.	Una región P. Cinéticas de apertura y modulación muy complejas.	Kubo <i>et al</i> , 1993 Nichols y Lopatin, 1997
Cuatro (Dímeros)	Sensible a estímulos mecánicos y a segundos mensajeros.	KCNK, TASK, TREK, TRAAK, TWIK.	Canales de fuga. Con dos regiones P en una subunidad α . Ligera rectificación entrante.	Biggin <i>et al</i> , 2000 Wang <i>et al</i> , 1999
Seis (Tetrámeros)	Dependiente de voltaje (Kv).	KCN, HCN, TRP, canales activados por baja y media conductancia.	Una región P. Repolarización de la membrana durante un potencial de acción.	Aidley <i>et al</i> , 1998 Hille, 1992
Siete (Tetrameros)	Dependiente de voltaje (Kv).	BK: canales activados por alta conductancia.	Grupo amino del lado extracelular. Repolarización de la membrana durante un potencial de acción.	Ruppersberg <i>et al</i> , 1990 Shen <i>et al</i> , 1993
Ocho (Dímeros)	Apertura por despolarización y decremento de K^+ externo.	TOK.	Corriente saliente de potasio. Bloqueo por Mg^{2+} dependiente del voltaje. Con dos regiones P en una subunidad α .	Lesage <i>et al</i> , 1996 Biggin <i>et al</i> , 2000

2.3 Canales de K^+ rectificadores entrantes (Kir).

Los canales de K^+ cuya subunidad α tiene dos segmentos transmembranales (M1 y M2) se denominan Kir. Entre los segmentos M1 y M2 se encuentra la región que forma el poro; al igual que los canales Kv se agregan en tetrámeros para formar un canal funcional (Kubo *et al*, 1993). Aunque los canales Kir parecen ser topológicamente menos complejos que el resto de la familia, sus cinéticas de apertura, activación e inactivación, así como su modulación por cationes y PIP₂, entre otras, son complejas (Nichols y Lopatin, 1997).

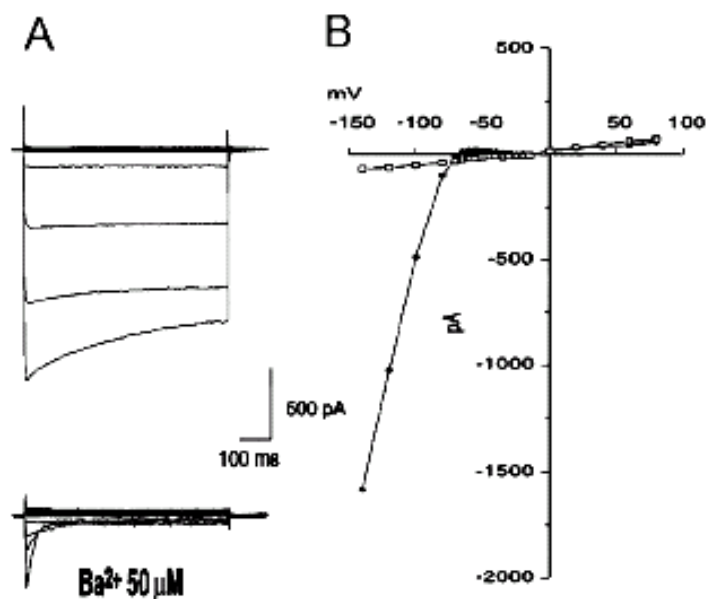


Modificado, Bichet *et al.* 2003 y Kuo et al 2005.

FIGURA 5. *Topología de los canales Kir.* A) Representación de una subunidad α con dos segmentos transmembranales (M1 y M2), la región del poro (P), el amino (N) y el carboxilo (C) terminales citoplasmáticos. B) Vista extracelular del tetrámero de un canal Kir. C) Arreglo de los dominios transmembranales de dos subunidades α . Las esferas representan los iones K^+ en el filtro de selectividad. M1 y M2 están inmersos en la membrana plasmática (MP).

Los canales iónicos abiertos permiten el movimiento siempre a favor de su potencial electroquímico. Sin embargo, los canales *rectificadores* son de dirección única. Es decir, solo permiten el movimiento del ión en un sentido y no en el otro, aunque se encuentren abiertos. Se les denomina *rectificadores*, por analogía a los diodos rectificadores en electrónica, que permite el paso de los electrones en un sentido y no en el otro (<http://webpages.ull.es/>).

La corriente de rectificación entrante puede observarse sólo cuando se aplican voltajes por debajo del potencial de equilibrio del K^+ y declina con la despolarización de la membrana (Esquema 1A y 1B). Los canales se bloquean por bario (Ba^{2+}) externo (Esquema 1A) y se han estudiado en preparaciones diversas como son los ovocitos de estrellas de mar (Hagiwara y Takahashi, 1974), las células del músculo esquelético (Standen y Stanfield, 1978), del músculo cardiaco (Matsuda y Sperelakis, 1993), las células β del páncreas (Inagaki *et al.*, 1995) y los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Bauer *et al.*, 1996; Hedin *et al.*, 1996; Salvador *et al.*, 2001).



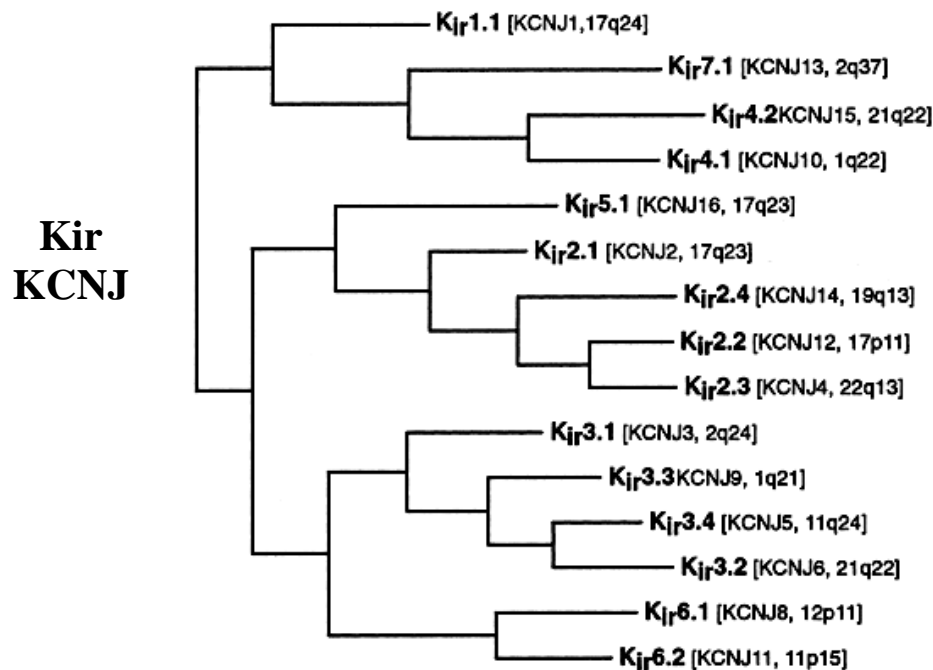
ESQUEMA 1. *Curso temporal de las corrientes de K⁺ de los canales Kir.* A) Canales de potasio Kir2.1 transfectados en células BRL-1. Protocolo de pulsos de -140 a +80 mV, con incrementos de 20 mV, y un potencial de mantenimiento de -60 mV. El panel inferior muestra el bloqueo de la corriente al adicionar Ba²⁺. B) Relación corriente- voltaje (I/V) de las corrientes registradas en A, los círculos oscuros muestran la corriente control y los cuadros claros muestran la corriente registrada en presencia de Ba²⁺. (Tomada de Bianchi *et al*, 1996).

El papel de los canales Kir es mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ión potasio (E_K). Los canales Kir juegan un papel importante en el control del tono vascular, la frecuencia cardiaca, la señalización neuronal y la excitabilidad celular (Hille, 1992). Algunos de estos canales pueden ser modulados en forma indirecta por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores, componentes intracelulares y membranales como los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, el ATP, las cinasas, el pH y las proteínas heterotriméricas G, entre otros factores (Ruppersberg *et al*, 2000).

Los Kir permiten la entrada pero no la salida del K⁺, pues su rectificación depende de la presencia de magnesio o iones poliaminas (particularmente espermina y espermidina) en el espacio intracelular, que bloquean el interior del poro a voltajes mayores a E_K y evitan un flujo de K⁺ hacia el exterior (Lopatin *et al*, 1994).

2.3.1 Clasificación.

En 1995 Doupnik y colaboradores agruparon a los canales Kir en varias subfamilias tomando como base su secuencia de aminoácidos y sus propiedades. Los canales que muestran más del 65% de identidad se agrupan dentro de una misma subfamilia; a su vez, la organización del genoma humano (HUGO) ha asignado la nomenclatura de KCNJ para los canales Kir (Gutman *et al*, 2003). En la actualidad se han identificado siete subfamilias (Kir1- Kir7), algunas se encuentran más relacionadas entre sí que otras (Esquema 2).



ESQUEMA 2. *Árbol filogenético de los canales Kir.* Entre corchetes se muestra la nomenclatura de los canales según HUGO [Modificada de Gutman *et al*. 2003].

2.4 La subfamilia Kir3 (GIRK) activada por el dímero G $\beta\gamma$.

Un experimento clásico de transmisión química en la sinapsis, es la estimulación del nervio vago que secreta acetilcolina y ocasiona una disminución en el ritmo cardiaco (Loewi, 1921). La acetilcolina actúa en receptores muscarínicos m2 acoplados a proteínas Gi/Go a nivel del nodo sinoauricular, lo que provoca la disociación de las proteínas Gi, cuyas subunidades G $\beta\gamma$ abren los canales de potasio rectificadores entrantes de la subfamilia KIR 3.x (GIRK), originando la corriente típica I_{K_{ACh}}. El heteromultímero GIRK1/GIRK4 da origen a la I_{K_{ACh}} (Krapivinsky *et al*, 1995).

Los canales GIRK se expresan en corazón, sistema nervioso (central y periférico), las plaquetas (Shankar *et al*, 2006) y las células cancerosas de mama y pulmón (Dhar y Plummer, 2006). Cinco miembros de la subfamilia GIRK se han clonado hasta la fecha. Los canales GIRK1 (Kubo *et al*, 1993) y GIRK4 (Krapivinsky *et al*, 1995) se clonaron de aurícula de ratón mientras que GIRK2 y GIRK3 del cerebro de mamíferos (Lesage *et al*, 1994). En contraste, la isoforma GIRK5 se clonó de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Hedin *et al*, 1996).

En cuanto a la asociación de estos canales, se ha identificado que el canal GIRK1 usualmente colocaliza con los canales GIRK2, GIRK3 o GIRK4 en el cerebro de ratón (Karschin *et al*, 1997). Esta observación y estudios posteriores indican que los canales GIRK de mamífero se agregan como heterotetrámeros del canal GIRK1 con cualquier otra subunidad (GIRK2, GIRK3 o GIRK4). Estos heterotetrámeros forman canales funcionales con propiedades idénticas a la corriente cardíaca IK_{ACh} (Kennedy *et al*, 1999, Jelacic *et al*, 1999).

En cuanto a homotetrámeros, se han identificado canales funcionales formados por algunas de las variantes de los canales GIRK2 en testículo de ratón (GIRK2d) (Inanobe *et al*, 1999) y homotetrámeros no funcionales del canal GIRK4 en la aurícula bovina (Corey y Clapham, 1998).

2.4.1. Canales GIRK en células no excitables.

La presencia de estos canales no está restringida a células excitables. En las plaquetas humanas se han encontrado los canales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 que son activados a través de los receptores $P2Y_{12}$ acoplados a proteínas G (Shankar *et al*, 2006). En células cancerosas de pulmón se ha detectado la expresión de mRNA de los canales GIRK1/GIRK4 (Plummer *et al*, 2004). De igual forma, en líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado la existencia de canales funcionales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 involucrados en la señalización celular (Dhar y Plummer, 2006).

El canal GIRK5 localizado en los ovocitos de *X. laevis* se encuentra en forma de homomultímeros funcionales que son activados por una poza endógena de subunidades Gβγ (Lutz *et al*, 2000).

TABLA 2. Localización y forma de asociación de las subunidades de la subfamilia Kir3 ó GIRK.

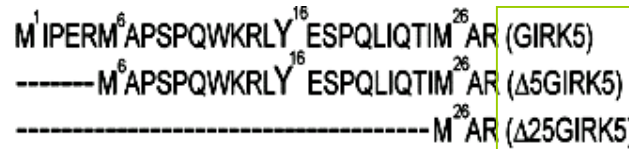
MULTÍMEROS	TIPO DE CÉLULAS	EJEMPLO	LOCALIZACIÓN	ORGANISMO
Hetero-tetrámeros.	Excitables.	GIRK1/GIRK4	Corazón.	Mamíferos (humano, rata y ratón).
		GIRK1/ GIRK(2,3,4)	Sistema nervioso.	
	No excitables.	GIRK1/ GIRK(2,4)	Plaquetas.	
		GIRK1/GIRK2 GIRK1/GIRK4	Células cancerosas (mama y pulmón).	
Homo-tetrámeros.	Excitables.	GIRK2	Testículos de ratón.	Anfibio <i>X. laevis</i> .
	No excitables.	GIRK5	Ovocitos de la rana <i>X. laevis</i> .	

2.5 Un canal endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*: el canal de potasio GIRK5.

Los ovocitos de la rana *X. laevis* se han utilizado ampliamente en investigación en áreas como biología del desarrollo, cascadas de señalización intracelular, rutas bioquímicas y fenómenos relacionados al transporte. Aunque se han desarrollado varios sistemas de expresión, el más favorecido se basa en la inyección de RNAm o DNA en los ovocitos. Cuando el RNA que se traduce origina un receptor, una proteína transportadora o un canal iónico, estos resultan funcionales y conservan sus propiedades fármaco- y electrofisiológicas. Esto vuelve al ovocito un modelo para investigar el proceso de transporte a nivel celular. Como los ovocitos se utilizan como un sistema de expresión heteróloga, es necesario ubicar que presentan algunas corrientes endógenas (Weber, 1999).

Las corrientes endógenas principales incluyen a las de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (Barish *et al*, 1983), de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Miledi *et al*, 1982), de K⁺ del tipo rectificador tardío (Lu *et al*, 1990) y de potasio del tipo rectificador entrante (Bauer *et al*, 1996). La corriente rectificadora entrante muestra que a voltajes hiperpolarizantes se induce un incremento de la conductancia de K⁺ seguida por una inactivación. Se ha observado que la amplitud de la corriente endógena varía de 0.2 a 1.5 μA y en algunos lotes de ovocitos es difícil detectarla (Bauer *et al*, 1996). A partir de estas observaciones surge el interés por conocer ¿de qué depende que los canales sean funcionales?.

En 1996 el grupo de Clapham reportó la clonación del canal de potasio rectificador entrante endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus*, Kir 3.5 o GIRK5 (XIR) y en su secuencia se puede ver que tiene tres posibles sitios de inicio correspondientes a las metioninas localizadas en la posición 1, 6 y 26 del amino terminal.



Posteriormente se obtuvieron las tres isoformas del canal GIRK5 (GIRK5, $\Delta 5$ GIRK5 y $\Delta 25$ GIRK5) y se estudió la expresión funcional de cada homomultímero en los ovocitos de *X. laevis*. Se demostró que únicamente la isoforma más corta era funcional ($\Delta 25$ GIRK5) (Salvador *et al*, 2001).

En los primeros 25 aminoácidos de la secuencia del canal GIRK5 y $\Delta 5$ GIRK5 se encuentra un residuo de tirosina (Y16) que se ubica dentro de una secuencia probable de fosforilación (I/L-Y-D/E-X-L) (Schmitz *et al*, 1996). La mutación de este residuo de tirosina por alanina (Y16A) promueve la expresión funcional del canal GIRK5. Lo anterior se determinó utilizando quimeras de las isoformas GIRK5, $\Delta 25$ GIRK5 y la mutante Y16A con la proteína verde de fluorescencia aumentada (EGFP), expresadas en ovocitos de *X. laevis*. Mora y Escobar (2005) observaron que tanto la isoforma $\Delta 25$ GIRK5 como la mutante Y16AGIRK5 se encontraban en la membrana plasmática y eran funcionales (Figura 6).

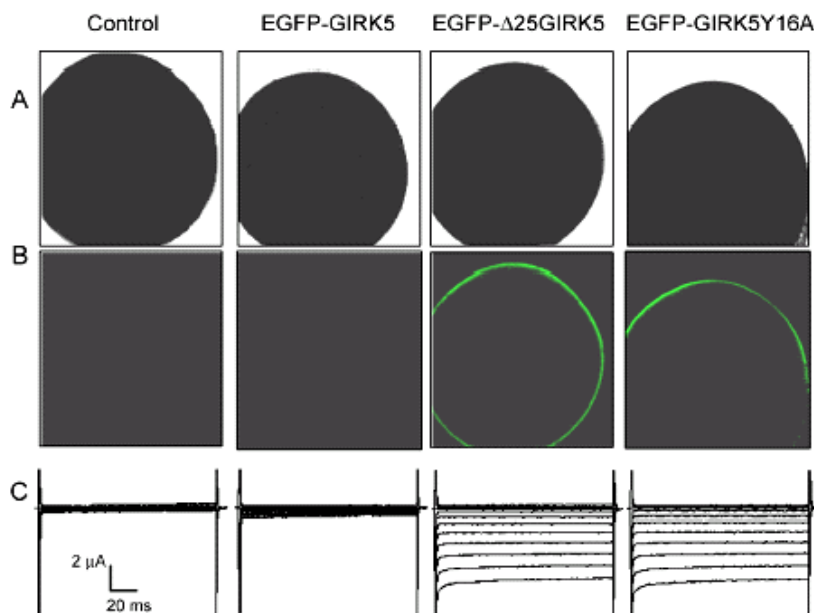


FIGURA 6. Expresión de las proteínas de fusión con la EGFP. A) Localización de los ovocitos dentro del campo óptico. Imágenes obtenidas en contraste de fases. B) Ovocitos observados con el microscopio confocal. C) Registros de la corriente de los ovocitos observados en A y B. (Tomado de Mora y Escobar, 2005).

2.6 Localización intracelular de proteínas.

2.6.1 Péptido señal y secuencias topogénicas.

Las células de organismos eucariotes están altamente compartimentalizadas: contienen organelos diversos con una composición particular de proteínas y lípidos. Por lo tanto, no es sorprendente que se requieran mecanismos de transporte altamente específicos para dirigir moléculas hacia localizaciones definidas, que garanticen la identidad y función de los compartimentos individuales.

Las proteínas contienen información estructural que las dirige hacia su destino correcto y esto ocurre a través de señales de localización. A pesar de que la síntesis de la mayor parte de las proteínas comienza en los ribosomas libres, las proteínas cuyo destino es ser secretadas o residir a lo largo de la vía secretora, contienen un *péptido señal* ubicado típicamente en el amino terminal, éste las dirige hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), en donde se transloca el polipéptido (Alberts *et al*, 2002; van Vliet *et al*, 2003).

Los organelos de la vía secretora están involucrados en la clasificación de las proteínas hacia los distintos compartimentos intracelulares. A través de esta vía, las proteínas pueden transportarse en vesículas hacia los lisosomas o ser retenidas como ‘residentes’ en alguno de los organelos (Alberts *et al*, 2002; van Vliet *et al*, 2003).

El péptido señal que dirige a las proteínas en formación hacia el RE está formado por uno o más residuos de aminoácidos de carga positiva, seguido por un segmento continuo de 6-12 residuos hidrófobos (Alberts *et al*, 2002; Lodish *et al*, 2002).

Para las proteínas de secreción, una vez que se translocan a la membrana del RE, el péptido señal se escinde por una peptidasa localizada también en el RE, en donde un número de proteínas chaperonas pliegan a la proteína en la conformación correcta.

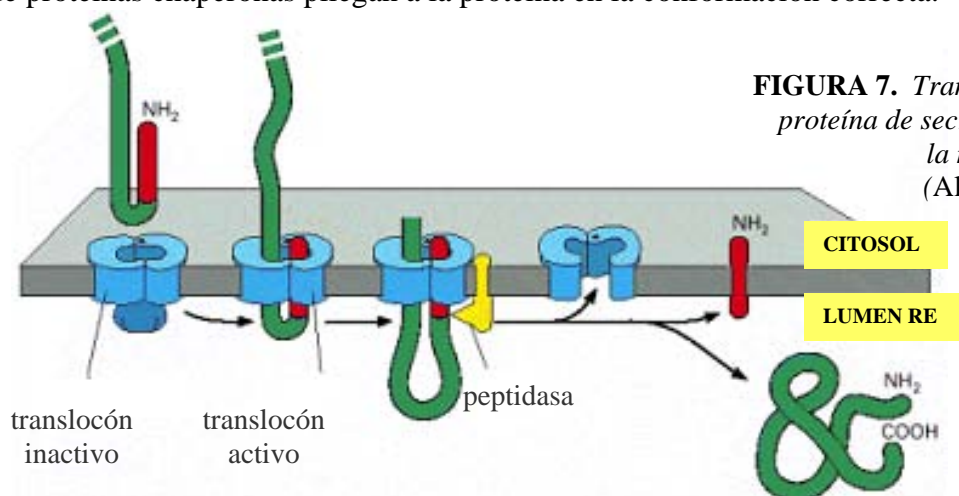


FIGURA 7. Translocación de una proteína de secreción a través de la membrana del RE (Alberts *et al*, 2002).

Otro tipo de proteínas, las integrales de membrana, poseen una orientación singular con respecto a la bicapa fosfolipídica. Estas proteínas se sintetizan en la membrana del RE y permanecen asociadas a membrana mientras se mueven hacia sus destinos definitivos. Durante este transporte la topología de la proteína se preserva. Por lo tanto, la orientación de estas proteínas en sus sitios definitivos se establece durante la biosíntesis en la membrana del RE. Estas proteínas interactúan con membranas de forma diferente. Muchas contienen un solo segmento que cruza toda la membrana (de paso simple) y otras poseen múltiples segmentos α -helicoidales que la atraviesan (paso múltiple). A pesar de esta variación, la inserción de todas ellas en la membrana del RE depende de *secuencias topogénicas* específicas. Estas secuencias de hasta 25 aminoácidos, aseguran que una proteína adquiera la orientación adecuada durante su inserción en la membrana (Alberts *et al*, 2002; Lodish *et al*, 2002).

Muchas proteínas importantes, como son las bombas iónicas, los canales iónicos y los transportadores, atraviesan la membrana varias veces. En estas proteínas de paso múltiple se cree que cada hélice- α que atraviesa la membrana actúa como secuencia topogénica. El primer segmento α -helicoidal inicia la inserción en la membrana del RE de la cadena en crecimiento. Esta secuencia funciona como la secuencia interna de señal-fijación no escindida (Lodish *et al*, 2002).

Conforme la cadena polipeptídica naciente que sigue a la primera hélice- α en una proteína de paso múltiple se alarga, también se mueve a través de un complejo proteico, conocido como translocón, hasta que se forma la segunda hélice α hidrófoba. Esta hélice actúa como secuencia de detención de transferencia y de fijación a la membrana, por lo que impide la salida adicional de la cadena naciente a través del translocón. En consecuencia, tras la síntesis de las dos primeras hélices- α transmembrana, ambos extremos de la cadena naciente están en el citosol y hacia la luz mira un asa (Lodish *et al*, 2002). Ver figura 8.

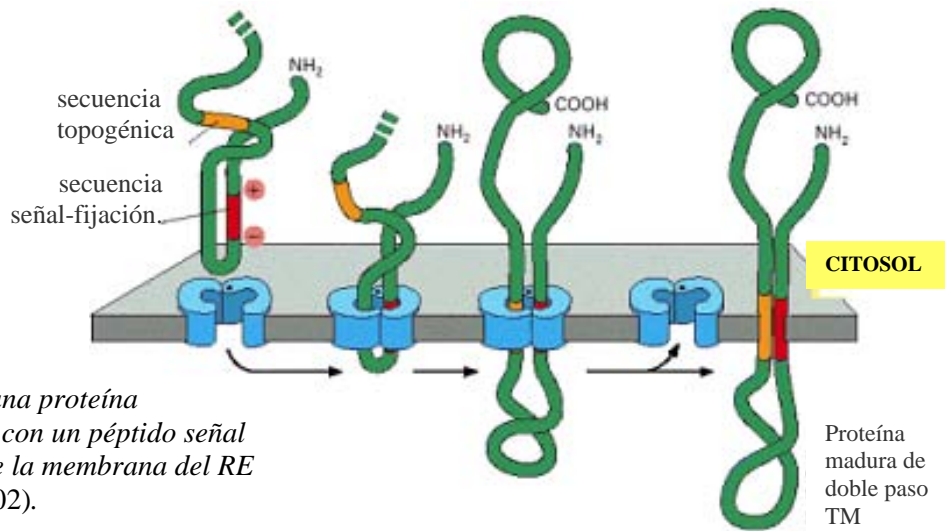


FIGURA 8.
Integración de una proteína transmembranal, con un péptido señal interno, dentro de la membrana del RE
 (Alberts *et al*, 2002).

2.6.2 Motivos de localización intracelular.

Para comprender los principios generales con los cuales operan las señales de localización intracelular, es importante distinguir tres diferentes rutas por las cuales cada proteína se mueve desde un compartimiento a otro. En primer lugar, el transporte de proteínas por poros como el que ocurre entre el citosol y el núcleo. En segundo lugar está el transporte transmembranal, donde ciertos complejos unidos a la membrana translocan a las proteínas desde el citosol hacia un organelo. Un ejemplo es el transporte de proteínas desde el citosol hacia el lumen del RE o a la matriz mitocondrial. Este tipo de transporte es el que ocurre por el reconocimiento del péptido de señal en proteínas de secreción o transmembranales (Alberts *et al*, 2002).

Por último, el transporte vesicular, con intermediarios que son pequeñas vesículas de transporte esféricas o largas, o fragmentos de organelos formados irregularmente. El transporte por vesículas comienza con moléculas desde el lumen de un compartimiento y se descarga al fusionarse con un segundo compartimiento. La transferencia de proteínas desde el RE hacia el aparato de Golgi ocurre de esta forma (Alberts *et al*, 2002).

Cada uno de estos modelos de transferencia de proteínas es usualmente guiado por señales de clasificación en el transporte de proteínas que son reconocidas por receptores complementarios. Si una proteína larga es importada hacia el núcleo, debe poseer una señal de clasificación que es reconocida por un receptor de proteínas que la guíe a través del complejo del poro nuclear. Si una proteína se transfiere directamente a través de la

membrana, debe poseer una señal de clasificación que sea reconocida por el translocador y por la membrana que cruza. Y si está cargada dentro de un cierto tipo de vesículas o retenida en organelos, su señal de localización debe ser reconocida por un receptor complementario en la membrana apropiada (Alberts *et al*, 2002).

Cada secuencia señal especifica un destino particular en la célula. De las proteínas que en un principio se transfieren hacia el RE por una secuencia señal en su amino terminal, algunas pasarán hacia el aparato de Golgi, pero aquellas con una secuencia específica de cuatro aminoácidos en su carboxilo terminal (KDEL) son reconocidas como residentes del RE y son regresadas hacia él. Es así, que por medio de secuencias de aminoácidos se selecciona a las proteínas que deben recorrer la vía secretora y a aquellas que deben entrar en el transporte retrógrado como residentes del organelo anterior (Alberts *et al*, 2002; Lodish *et al*, 2002; van Vliet *et al*, 2003).

Por otra parte, las proteínas destinadas hacia las mitocondrias tienen secuencias señal de otro tipo, en las cuales aminoácidos cargados positivamente alternan con aminoácidos hidrofóbicos. Finalmente, algunas proteínas destinadas hacia peroxisomas tienen un péptido señal de tres aminoácidos característicos (SKL) en su carboxilo terminal. Algunas secuencias señal específicas se presentan en la tabla 3 (Lodish *et al*, 2002).

TABLA 3. Señales de localización de proteínas en distintos tipos de organelos (Lodish *et al*, 2002).

Secuencia señal	Proteínas con señal	Vesículas que incorporan proteínas con señal.
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	Proteínas luminales residentes en el RE.	COPI
Lys-Lys-X-X (KKXX)	Proteínas de membrana residentes en el RE (dominio citosólico).	COPI
Manosa 6-fosfato (M6P)	Enzimas lisosómicas solubles después de ser procesadas en el <i>cis</i> -Golgi.	Clatrina /AP1
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	Receptor LDL en la membrana plasmática (dominio citosólico).	Clatrina /AP2
Tyr-X-X-Φ (YXXΦ)	Proteínas de membrana en red <i>trans</i> -Golgi (dominio citosólico).	Clatrina/AP1
	Proteínas de la membrana plasmática (dominio citosólico).	Clatrina /AP2
Leu-Leu (LL)	Proteínas de la membrana plasmática (dominio citosólico).	Clatrina/AP2

Las secuencias señal son suficientes para la localización de las proteínas. Aunque las secuencias de aminoácidos puedan variar un poco, las secuencias señal de las proteínas mantiene su destino y funcionalidad. Propiedades físicas tales como la hidrofobicidad, frecuentemente demuestran ser más importantes en el proceso de reconocimiento de la señal que la secuencia de aminoácidos exacta (Lodish et al, 2002).

Muchas proteínas no tienen señales de clasificación y consecuentemente permanecen en el citosol. En la vía secretora de la célula, una vez que las proteínas son dirigidas hacia el RE, las recién sintetizadas se revisan para asegurar su plegamiento correcto, se glicosilan antes de ser empacadas en las vesículas y entonces son movidas hacia el cis-Golgi. Las proteínas se transportan a través de las cisternas del aparato de Golgi hacia la red de *trans*-Golgi (TGN). En el TGN las proteínas se clasifican de acuerdo a sus destinos finales que dependen de motivos de localización (Alberts et al, 2002; Lodish et al, 2002; van Vliet et al, 2003).

Un motivo se define como una región, dominio específico o secuencia breve de aminoácidos que se comparte entre proteínas que no necesariamente presentan homología en el resto de sus secuencias y que indica una correlación funcional en las proteínas que lo poseen. La mutación del motivo puede llevar a la pérdida de la función de la proteína. Esta acepción tiene un significado muy similar a la de una secuencia consenso de aminoácidos, aunque en este caso los aminoácidos conservados pueden estar separados entre sí (<http://tremedica.org>).

Los motivos tienden a poseer funciones similares conservando su secuencia y estructura a lo largo de la evolución. Los motivos conservados son el resultado de una selección sobre regiones específicas de las proteínas que se escogieron por ser requerimientos estructurales y/o funcionales importantes.

2.6.3 Motivos de localización endosomal-lisosomal y basolateral.

Varias de las señales caracterizadas hasta ahora para enviar las proteínas hacia los endosomas y los lisosomas se encuentran en el dominio citosólico de las proteínas transmembranales. Estas señales consisten en arreglos en línea y cortos de residuos de aminoácidos que no son exactamente secuencias conservadas pero que generan motivos de

cuatro a siete residuos. Los residuos son generalmente voluminosos o hidrofóbicos, aunque también los residuos con carga son determinantes en la especificidad de esas señales. Dos de los principales motivos de señalización hacia endosomas-lisosomas se conocen como señales ‘basadas en tirosinas’ o ‘basadas en dileucinas’. Estas señales pueden ser consideradas como un subconjunto de un grupo mayor, que contemplan las interacciones que existen en los dominios de reconocimiento péptido-motivo, y que son características en la maquinaria de señalización endocítica y hacia los lisosomas. Lo que los hace distintos de otros motivos, es su presencia en los dominios citosólicos de las proteínas transmembranales (Bonifacino y Traub, 2003).

TABLA 4. Motivos de localización hacia los complejos endosomas/lisosomas (Bonifacino y Traub, 2003).

TIPO DE SEÑAL	FUNCIONES
Asn-Pro-X-Tyr NPXY	Internalización.
Tyr-X-X-Φ YXXΦ	Internalización, localización lisosomal y basolateral.
Asp-Glu-X-X-X-Leu-Leu-Ile [DE]XXXL[LI]	Internalización, localización lisosomal y basolateral.
Asp-X-X-Leu-Leu DXXLL	Clasificar las proteínas de TGN a endosomas.
Phe-Trp o P(n) FW o varias Prolinas FW- or P-rich	Clasificar de endosomas a TGN.
Asn-Pro-Phe-X(1,2)-Asp NPFX(1,2)D	Internalización.
Ubiquitina	Internalización, localización lisosomal y vacuolar.

Φ representa un residuo de aminoácido con cadena lateral hidrofóbica.

Los motivos de dileucina se identificaron cuando se estudiaban señales de internalización basadas en tirosinas que dirigían las proteínas hacia lisosomas o a endocitosis. Sin embargo, en algunos casos, aunque la proteína de interés no tenga residuos de tirosina, ésta se internaliza rápidamente y se libera a lisosomas. Análisis posteriores revelaron que un segmento que contenía la secuencia DKQTLL era responsable de esa actividad y, además, que ambos residuos de leucina eran necesarios. Finalmente, se dedujo que el residuo ácido también es importante para la señalización. De esta forma se obtuvieron los motivos [DE]XXXL[LI] y DXXLL; el cambio de la segunda leucina por una isoleucina no ocasiona pérdida de la actividad (Bonifacino y Traub, 2003; Letourneur F. y Klausner R., 1992).

Al parecer, el tipo de señales [DE]XXXL[LI] se encuentra presente desde proteínas animales hasta en proteínas de protozoarios, puesto que se han encontrado en aves, peces, *C. elegans*, tripanosomas y levaduras. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina de *S. cerevisiae* tiene una señal dileucina [DE]XXXL[LI] hacia vacuolas (equivalente a lisosomas en levaduras). Estas señales en proteínas de mamíferos regulan rápidamente la internalización y dirección hacia los compartimentos endosomas-lisosomas, sugiriendo con ello que pueden ser reconocidas tanto al nivel de la membrana plasmática como en organelos intracelulares (Bonifacino y Traub, 2003).

De igual forma, las secuencias que conforman este motivo dileucina han sido relacionadas con la localización basolateral en células epiteliales (células polarizadas). (Bonifacino y Traub, 2003; Matter et al, 1994).

3. METODOLOGÍA

Para determinar la localización del canal de potasio GIRK5, la isoforma $\Delta 25$ GIRK5 y la mutante Y16AGIRK5 en los ovocitos de la rana *X. laevis*, se siguió una estrategia experimental que se apoyó principalmente en dos técnicas: réplica en Western y microscopía confocal. Se llevó como se indica de forma abreviada en el diagrama 1.

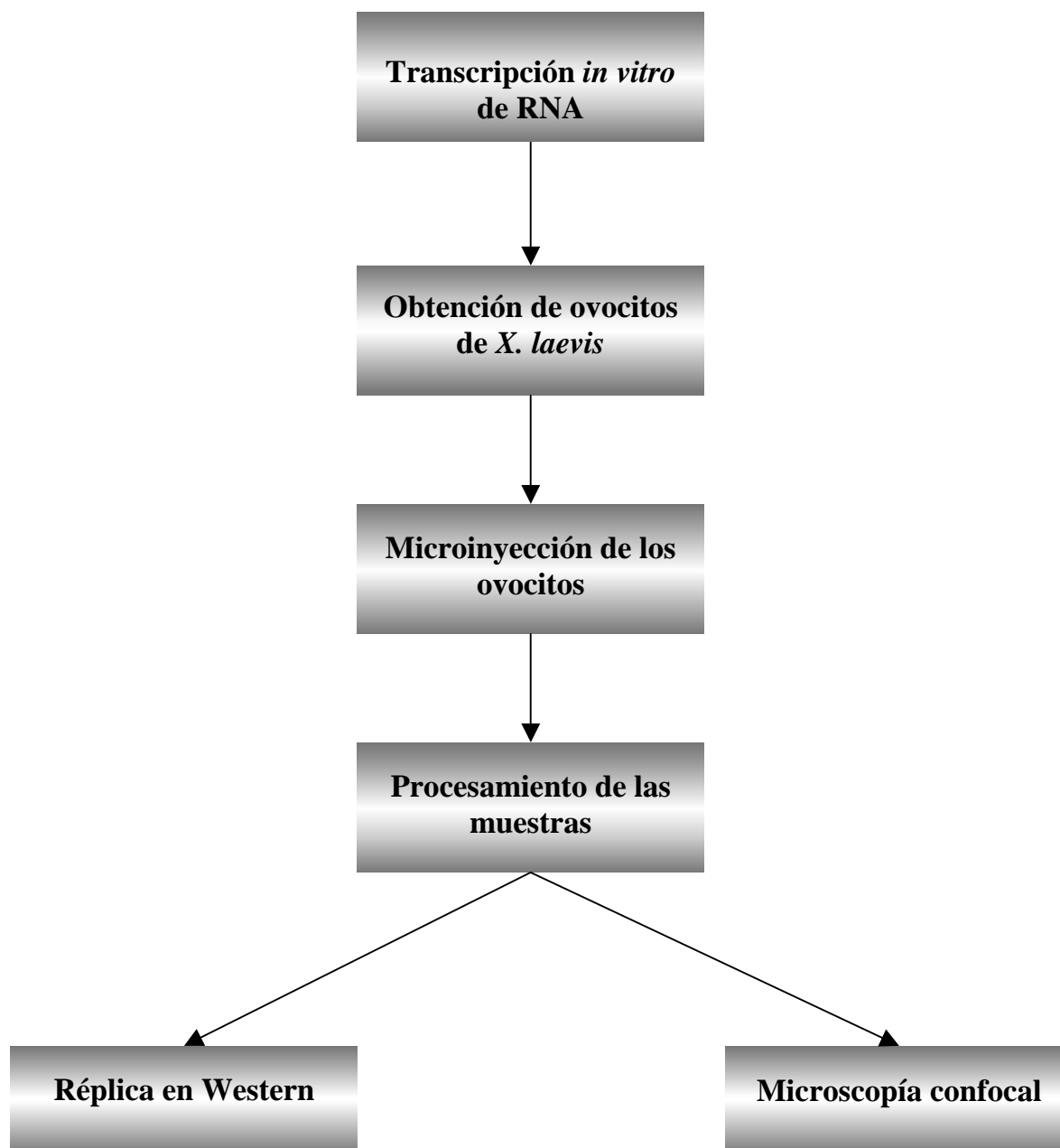


DIAGRAMA 1. Diagrama de flujo de la metodología experimental.

3.1 Transcripción *in vitro* de RNA.

Se realizó primero la linearización del vector que contiene el DNAC de las construcciones quiméricas, con la enzima de restricción Mlu I. Posteriormente, la transcripción se realizó con el kit mMMESSAGE mMACHINE (Ambion Corporation, Austin, TX) de acuerdo con las especificaciones del proveedor y con la enzima SP6 RNA polimerasa. Los distintos DNAC y RNA se analizaron en geles de agarosa al 1%. El RNA obtenido se diluyó con solución amortiguadora TE y se realizaron alícuotas de 1 μ L que se almacenaron a -70°C . La concentración del RNA se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

3.2 Obtención de los ovocitos.

Se anestesia la rana de la especie *Xenopus laevis* sumergiéndola, cubierta por una red o gasa de algodón, en hielo durante una hora; se realiza una ovariectomía parcial que consiste en cortar piel y músculo en la zona del vientre aproximadamente un centímetro arriba del pliegue del anca. Una vez abierta, se retiran los folículos con los ovocitos y éstos se abren con unas pinzas en una solución ND96 sin calcio. La rana se sutura y se deja en agua fría mientras se recupera de la anestesia. Los ovocitos incuban durante hora y media en una solución de ND96 con colagenasa 0.9 mg/mL con la finalidad de remover el saco vitelino de los mismos. Transcurrido este tiempo se realizan 5 lavados de los ovocitos con medio ND96 sin calcio para remover la colagenasa, 5 lavados con medio ND96 con calcio y por último 5 con medio ND96 con calcio y gentamicina para preservarlos a 18°C .

3.3 Microinyección de los ovocitos.

Transcurridas 24 horas de la obtención de los ovocitos, se seleccionan aquellos que estén en el estadio V –VI (de buen tamaño, consistencia y forma redondeada). Para la inyección se descongela la muestra de RNA almacenada a -70°C , y se diluye con una solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) para lograr una concentración final aproximada de 20 ng por ovocito. Posteriormente, se lleva a cabo la inyección de 50 nL en los ovocitos mediante un manipulador y un microinyector manual. Los ovocitos inyectados se almacenaron a 18°C durante 6 días para permitir la traducción del RNA inyectado.

3.4 Réplica en Western.

El fundamento de la réplica en Western consiste en llevar a cabo una interacción de forma específica entre un anticuerpo y su epítipo antigénico (secuencia particular de aminoácidos) que se encuentra expuesto por la proteína de interés, la cual se fija en un soporte sólido. El método de reconocimiento de esta interacción utilizado fue el de emisión de luz no radiactivo (ECL: Enhanced Chemiluminiscence), mediante el empleo de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano, misma que cataliza la reacción de quimioluminiscencia del luminol (diacilhidrazida cíclica) en presencia de peróxido de hidrógeno, el producto de la oxidación (éster de acridinio) alcanza un estado energético excitado que al decaer emite la luz que se detecta por autoradiografía (Amersham Biosciences, www1.gelifesciences.com).

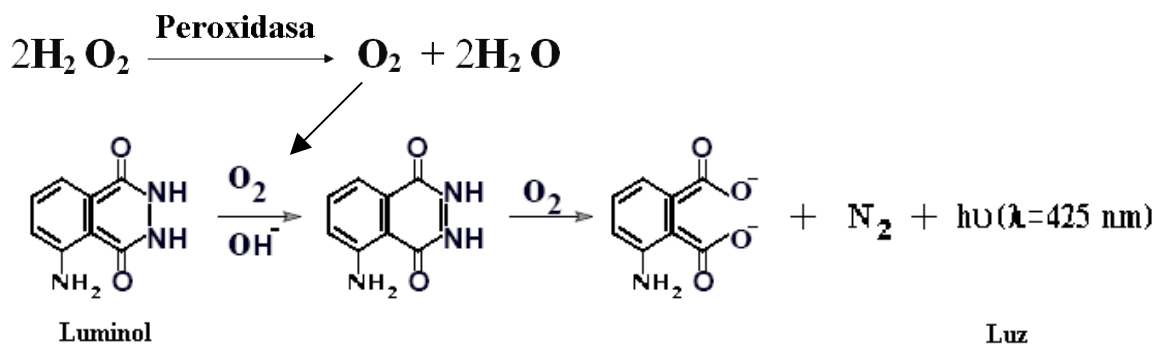


FIGURA 9. Reacción quimioluminiscente por oxidación del luminol.

Al cuarto día después de la inyección del RNA de los canales EGFP-GIRK5, EGFP- Δ 25-GIRK5 y EGFP-GIRK5Y16A, los ovocitos se homogenizaron en solución amortiguadora de lisis con inhibidor de proteasas (Complete, Mini, Roche). Se centrifugaron a 4000 g por duplicado para retirar la yema. El sobrenadante que contenía las membranas totales se mezcló con solución amortiguadora de carga (Laemmli, Biorad) y se denaturalizaron las proteínas a 95° C durante 5 min. La cantidad correspondiente a 10 ovocitos se separó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Las condiciones de la electroforesis fueron de 70 V para el gel concentrador, 110 V para el gel separador, con un gel de 1.0 mm de espesor.

Posteriormente se hizo una electrotransferencia usando una membrana de nitrocelulosa (Hybond-P, Amersham) como soporte sólido, a 20 V durante 1 h en la celda de transferencia. La membrana se bloqueó durante toda la noche en buffer salino con 1% de tween 20 (TBST) y 5% de leche descremada (BioRad), para disminuir las interacciones inespecíficas. Enseguida, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-GFP JL-8 (1:1000, Clontech), que reconoce un epítipo en la parte final de la proteína verde fluorescente, y se incubó 1 h más con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido a la peroxidasa de rábano (Amersham). La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó con el kit ECL Plus de Amersham y la señal se reveló en placas autorradiográficas.

3.5 Microscopía confocal

La microscopía confocal se ha utilizado para resolver la estructura de numerosos objetos en tercera dimensión, incluidas fibras de citoesqueleto, arreglos de cromosomas y genes en el núcleo, transporte intracelular, endocitosis, expresión génica, hibridación *in situ* con sondas fluorescentes, expresión y localización de proteínas u otro tipo de moléculas en 2 o 3 dimensiones, tanto en cultivos celulares como tejidos histológicos.

Los detalles ópticos de la microscopía confocal son complejos, aunque la idea básica es simple. El microscopio es generalmente utilizado con fluorescencia, pero en vez de iluminar la muestra completa una sola vez, el sistema óptico enfoca un punto único a una profundidad específica en la muestra. La fluorescencia emitida por el material iluminado es recogida y convertida a imagen en el detector de luz adecuado (Figura 10).

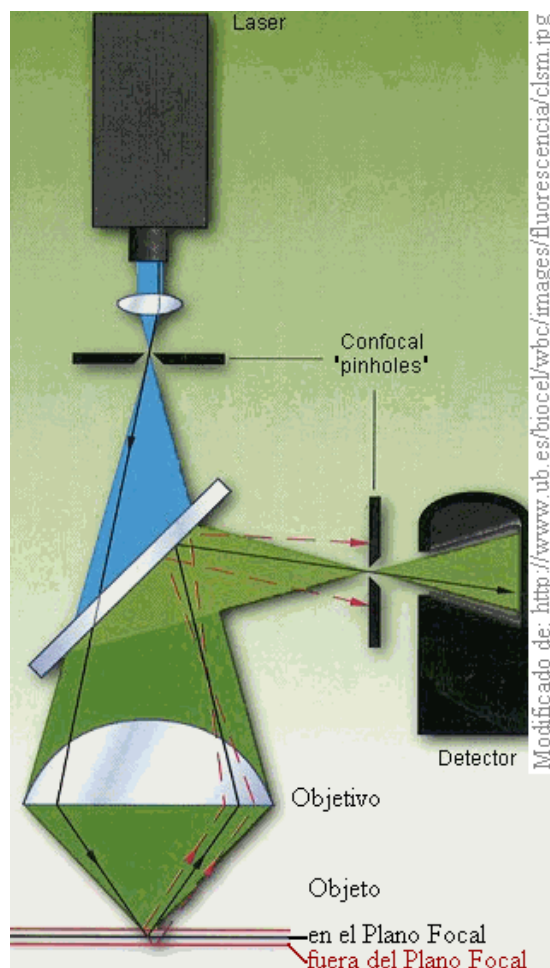
Se requiere una fuente de iluminación muy brillante, la cual es usualmente proporcionada por un laser cuya luz tiene que pasar a través de una primera ranura confocal (*pinhole* iluminador).

Una segunda apertura confocal (*pinhole* de convergencia) está colocada enfrente del detector en una posición **confocal** con el *pinhole* iluminador. Por lo tanto, la luz que viene desde el punto iluminado en la muestra converge en esta segunda apertura y entra en el detector.

En contraste, la luz emitida por diferentes regiones fuera del plano focal se encuentra también fuera de enfoque en la segunda apertura y es excluida en gran parte del detector.

Para construir una imagen en dos dimensiones, los datos de cada punto son recogidos secuencialmente mediante un barrido a través de un plano de la muestra y entonces son mostrados en una pantalla. El barrido se realiza por desviación de las emisiones de luz con un espejo oscilatorio (Alberts *et al*, 2002).

FIGURA 10. *Microscopio confocal.* Disposición básica de sus componentes.



Los ovocitos inyectados con el RNA de las quimeras EGFP-GIRK5, EGFP- Δ 25GIRK5 y EGFP-GIRK5Y16A se incubaron de 4 a 6 días a 18° C. Se tomó una muestra de 5 ovocitos por cada una de las mutantes y se incubó a 4° C toda la noche en una solución de PBS con paraformaldehído al 4% y en oscuridad. Los ovocitos se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% hasta que se embebieron de la solución; se mantuvieron en la oscuridad y a 4° C. Para cortarlos, los ovocitos se cubrieron con medio de congelamiento Tissue-Tek ® (alcohol polivinílico 10.24 % y glicol polietileno 4.26 %) a -25° C, con un crióstato se realizaron cortes de 10 μ m de espesor y se fijaron en portaobjetos gelatinizados.

Las preparaciones se montan en VECTASHIELD® para conservar su fluorescencia y se observan con el objetivo de 10X en el microscopio confocal (LEICA TCS PS5), con una línea de emisión de lámpara de argón a 488 nm y detección a 508 nm. El barrido XYZ se realizó aproximadamente en la región media de cada ovocito.

Para más detalle consultar el Apéndice.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Transcripción *in vitro* de RNA.

Anteriormente en el laboratorio se realizaron las quimeras de los canales GIRK5 con la proteína verde fluorescente (EGFP; Mora y Escobar, 2005). La unión de la EGFP quedó en el amino terminal de las proteínas. La quimera de la EGFP con el canal GIRK5 completo se denominó EGFP-GIRK5; la que contiene al canal sin los primeros 25 aminoácidos fue nombrada EGFP- Δ 25GIRK5 y por último la que contiene la mutación puntual de la tirosina 16 por una alanina, llamada EGFP-Y16AGIRK5.

El tamaño del DNA de EGFP-GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5 es cercano a 5351 pb, en tanto que para EGFP- Δ 25GIRK5 es de 5276 pb (Figura 11).

A partir del DNAc de las quimeras se procedió a obtener el RNA *in vitro* mediante el kit mMessage mMachine (Ambion Corporation, Austin, TX). Este proceso se puede evaluar mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

En la figura 11 se aprecia una banda de un tamaño aproximado de 5300 pb que corresponde al DNA linearizado de cada muestra.

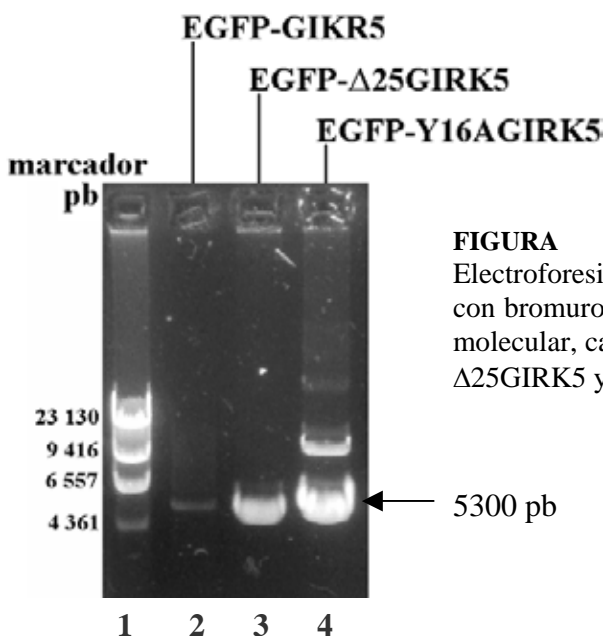


FIGURA 11. *Linearización del DNA.* Electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: EGFP-GIRK5, carril 3: EGFP- Δ 25GIRK5 y carril 4: EGFP-Y16AGIRK5.

Después de realizar la transcripción, se realiza nuevamente una electroforesis en gel de agarosa (figura 12). En los carriles 2 a 4 se observa una banda muy intensa de peso cercano a 2.348 kb la cual corresponde al RNAm de las quimeras, e indica que la transcripción *in vitro* se realizó satisfactoriamente obteniendo un RNA de buena calidad.

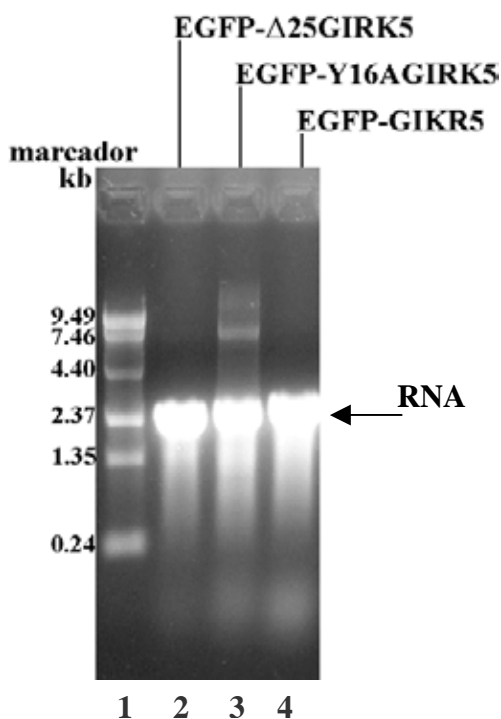


FIGURA 12. RNA transcrito *in vitro*. Electroforesis de RNA en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: EGFP- Δ 25GIRK5, carril 3: EGFP-Y16AGIRK5 y carril 4: EGFP-GIRK5

Se determinó la concentración del RNA mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm característica para ácidos nucleicos. Las concentraciones obtenidas se muestran a continuación.

RNA	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
EGFP-GIRK5	2.52
EGFP- Δ 25 GIRK5	1.91
EGFP-Y16A GIRK5	2.15

4.2 Réplica en Western.

Los ovocitos seleccionados fueron los que se encontraban en el estadio V y VI, porque estos son los ovocitos maduros que están en las etapas finales de la ovogénesis, se encuentran listos para ser fertilizados y por lo tanto permiten la expresión eficiente de material exógeno.

Al cuarto día se homogenizaron en una solución que contiene un inhibidor de proteasas para impedir que durante este proceso se degradaran las proteínas de interés. El homogenado se centrifugó y el sobrenadante que contenía la fracción de membranas totales se mezcló con solución de Laemmli que junto con la temperatura elevada, se promueve la desnaturalización de las proteínas.

Se realizó una separación de las proteínas por electroforesis en un gel de SDS-policacrilamida al 10%. El rango efectivo de separación de los geles de SDS-policacrilamida

depende de la concentración de poliacrilamida usada para formar el gel y de la cantidad del agente de entrecruzamiento. La concentración de 10% resulta ser óptima para separar proteínas en intervalos de peso molecular entre 31 y 97 kDa (Sambrook *et al*, 1989). El peso esperado para las quimeras es aproximado a 75kDa (45 kDa del canal GIRK5 y 30 kDa de la EGFP) por lo tanto la concentración del gel al 10% se consideró apropiada.

Previamente se utilizó a la proteína verde de fluorescencia aumentada (EGFP) para comprobar la especificidad del anticuerpo (figura 13), observando una banda de tamaño aproximado a 30 kDa que corresponde a la proteína EGFP, lo cual concuerda con lo reportado por el proveedor (masa molecular aparente entre 30 y 35 kDa en geles de SDS-poliacrilamida, Clontech).

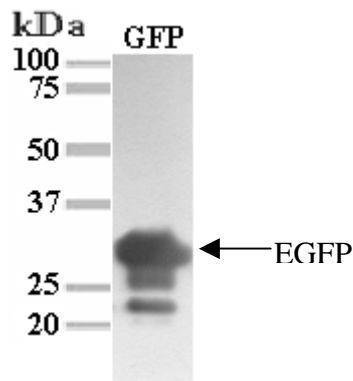


FIGURA 13. Especificidad del anticuerpo JL8 anti-GFP. Utilizando la proteína verde fluorescente GFP.

La cantidad de muestra cargada en cada carril se expresa comúnmente en número de ovocitos. Esta aproximación es posible porque se conoce el volumen agregado por cada uno tanto con la solución de lisis como con la solución Laemmli. De esta forma la cantidad de muestra por carril es la equivalente a 2.5 ovocitos.

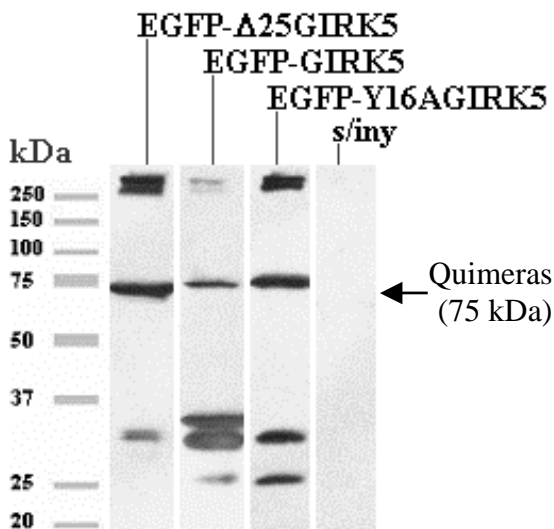


FIGURA 14. Inmuno réplica con anticuerpo monoclonal JL8 anti-GFP. Todos muestran el mismo orden de las muestras, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: EGFP- Δ 25GIRK5, carril 3: EGFP-GIRK5, carril 4: EGFP-Y16AGIRK5, carril 5: sin inyectar. Todos con 2.5 ovocitos de muestra por carril.

Las imágenes de la figura 14 muestran que se detectó una banda definida cercana al peso esperado de 75 kDa. Las bandas con pesos entre 37 y 25 kDa se atribuyen tanto a la EGFP, como a la degradación de las proteínas quiméricas. Se observan también bandas en la parte superior de peso mayor a 250 kDa que corresponden a agregados de las proteínas. La muestra de ovocitos sin inyectar no presenta la detección de ninguna banda actuando como control negativo. Los resultados son reproducibles para el 4°, 5° y 6° día de expresión.

Puede observarse que la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas quiméricas es diferente entre muestras, para la EGFP-GIRK5 es menor con respecto a las otras dos. Lo anterior puede deberse a la pérdida del canal GIRK5 en el proceso de centrifugación.

Estos resultados demuestran la existencia de las proteínas EGFP- Δ 25GIRK5, EGFP-GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5 en los ovocitos desde el cuarto, quinto y hasta el sexto día de expresión. Con una mayor expresión de EGFP- Δ 25GIRK5 en el 5° día mientras que para la quimera del canal completo EGFP-GIRK5 y la de la mutante EGFP-Y16AGIRK5 se observa en el 4°. Sin embargo, estos datos no indicaban en que parte de la célula se encontraban las construcciones y para ello se utilizó la microscopía confocal.

4.3 Microscopía confocal

Las imágenes del microscopio confocal se obtuvieron de los ovocitos en el cuarto, quinto y sexto día de expresión. Cortes de 10 μ m de espesor realizados en un crióstato se fijaron en portaobjetos gelatinizados para retener la muestra, fueron montados en Vectashield®, un compuesto que conserva por más tiempo la fluorescencia de las proteínas, y se observaron en el microscopio confocal con el objetivo 10X que permite observarlos en su totalidad.

Los cortes se hicieron con el ovocito orientado como se muestra en la figura 15, con el polo animal (polo pigmentado) en el lado derecho y el vegetal en el lado izquierdo, para así poder observar la distribución de las proteínas a través del ovocito y las posibles diferencias en su localización.



FIGURA 15. Ovocito de la rana *X. laevis*

En todas las figuras, cada corte de los ovocitos con las muestras EGFP- Δ 25GIRK5, EGFP-GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5 se muestra en tres imágenes: la primera es una imagen de transferencia que permite observar la estructura del corte, después está la imagen confocal donde la fluorescencia indica la emisión de luz por parte de las proteínas quiméricas y la última corresponde a un traslape de las dos primeras donde se observa la fluorescencia superpuesta en la estructura.

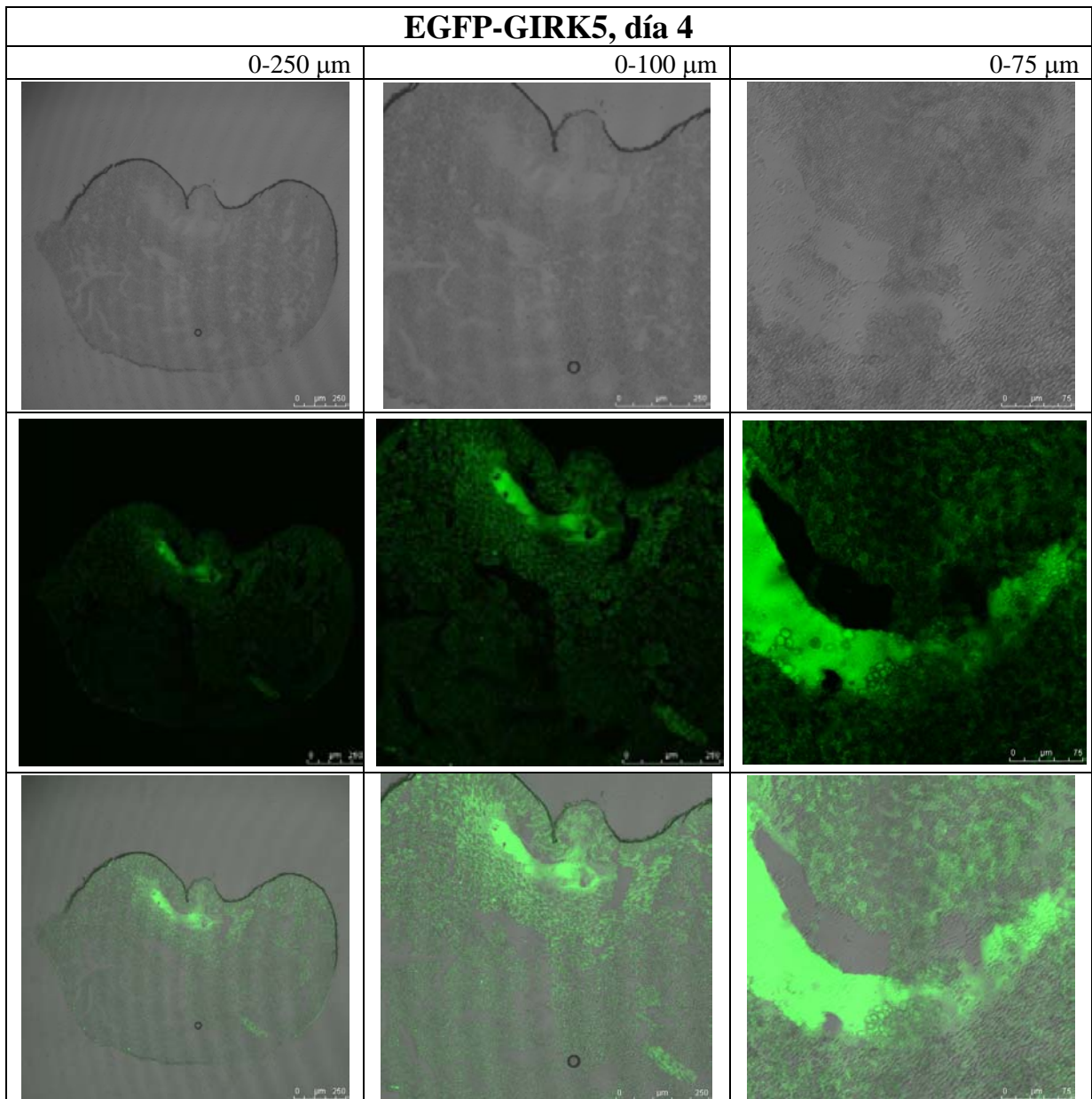
Cabe mencionar que el sistema de fijación con paraformaldehído hizo que varios ovocitos se deformaran un poco y por lo tanto algunos de los cortes no se observan totalmente redondeados, sin embargo se manifiestan las diferencias de la distribución de las proteínas. En la recepción de imágenes en el microscopio confocal, la orientación del ovocito resulta con el polo animal en la parte superior y el polo vegetal en la parte inferior. La diferencia entre los polos puede verse en la imagen de transferencia sin fluorescencia y en la superpuesta donde se observa la pigmentación más intensa de la membrana en el polo animal.

A continuación se presentan en cada figura las imágenes por muestra y día de expresión.

EGFP-GIRK5

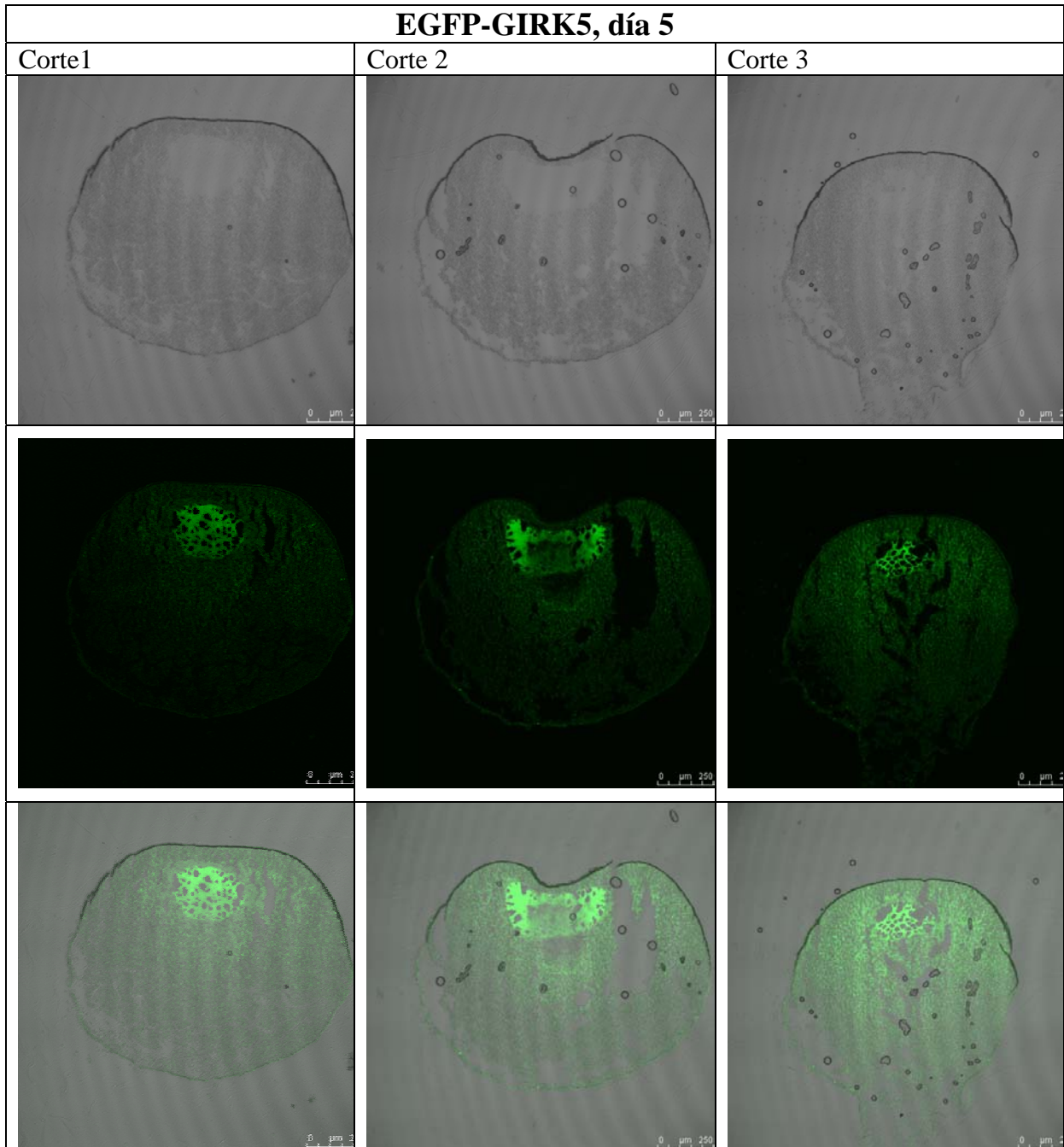
Para esta proteína se realizaron aumentos durante la toma de las imágenes, por lo tanto los resultados de cada día se muestran por separado. El canal de esta quimera tiene un tirosina previa al motivo EXXXLI que al estar fosforilada mantienen al canal endocitado (Mora y Escobar, 2005). Es por ello que la proteína quimérica se encuentra retenida aunque tenga el motivo de localización basolateral, lo cual se puede ver en las imágenes. Además, en el 4° día se observa en la columna derecha (la de mayor aumento) unos agregados que podrían ser vesículas de migración, mientras que en la del centro se aprecia en la parte inferior derecha una estructura desconocida con ligera acumulación de proteína.

FIGURA 16. Imágenes de microscopía confocal para EGFP-GIRK5. Día 4 de la expresión; la equivalencia del tamaño de la barra inferior se indica arriba de cada columna.



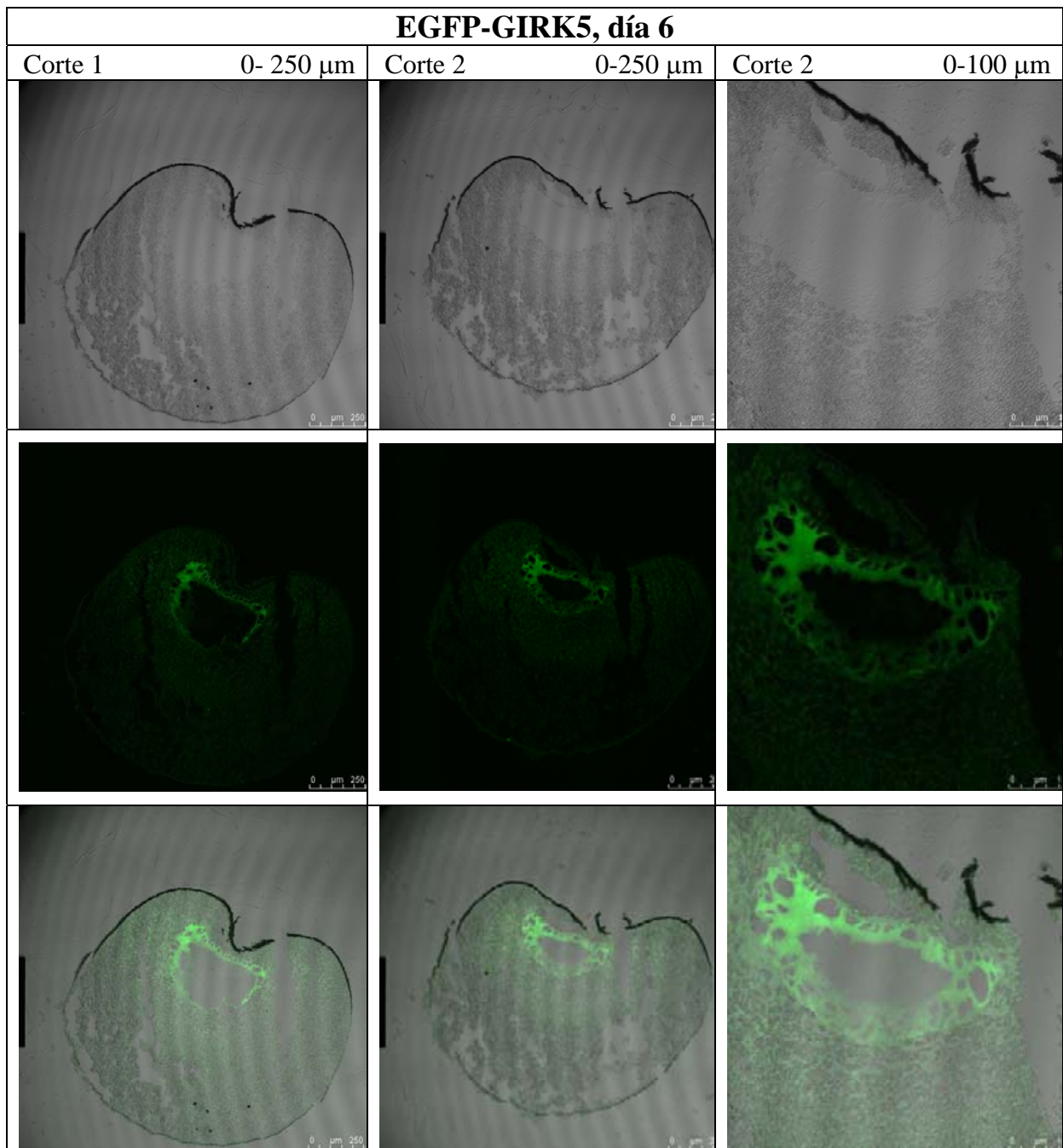
Del 5° día se presentan imágenes de 3 cortes de un mismo ovocito donde se puede observar una de las formas del organelo donde están retenidas las proteínas. La distribución a través del eje animal-vegetal es distinta: el núcleo y pequeños depósitos de yema se encuentran en el polo animal; el aparato de Golgi, depósitos mayores de yema y regiones especializadas del RE se encuentran en la mitad vegetal. De acuerdo a la forma que se observa y dado que el RE está en las cercanías del núcleo, se sugiere que la proteína se encuentra retenida en el RE.

FIGURA 17. Imágenes de microscopía confocal para EGFP-GIRK5. Día 5 de expresión, la barra inferior equivale a 250 μm .



Para el 6° día se muestran dos cortes y un aumento del último, donde se puede apreciar mejor la subestructura de retención de la proteína con características similares a la que se observa en el día anterior, lo cual sugiere que se mantiene ahí desde su expresión. Sin embargo, no puede concluirse a que organelo corresponde hasta que se utilicen marcadores de organelos.

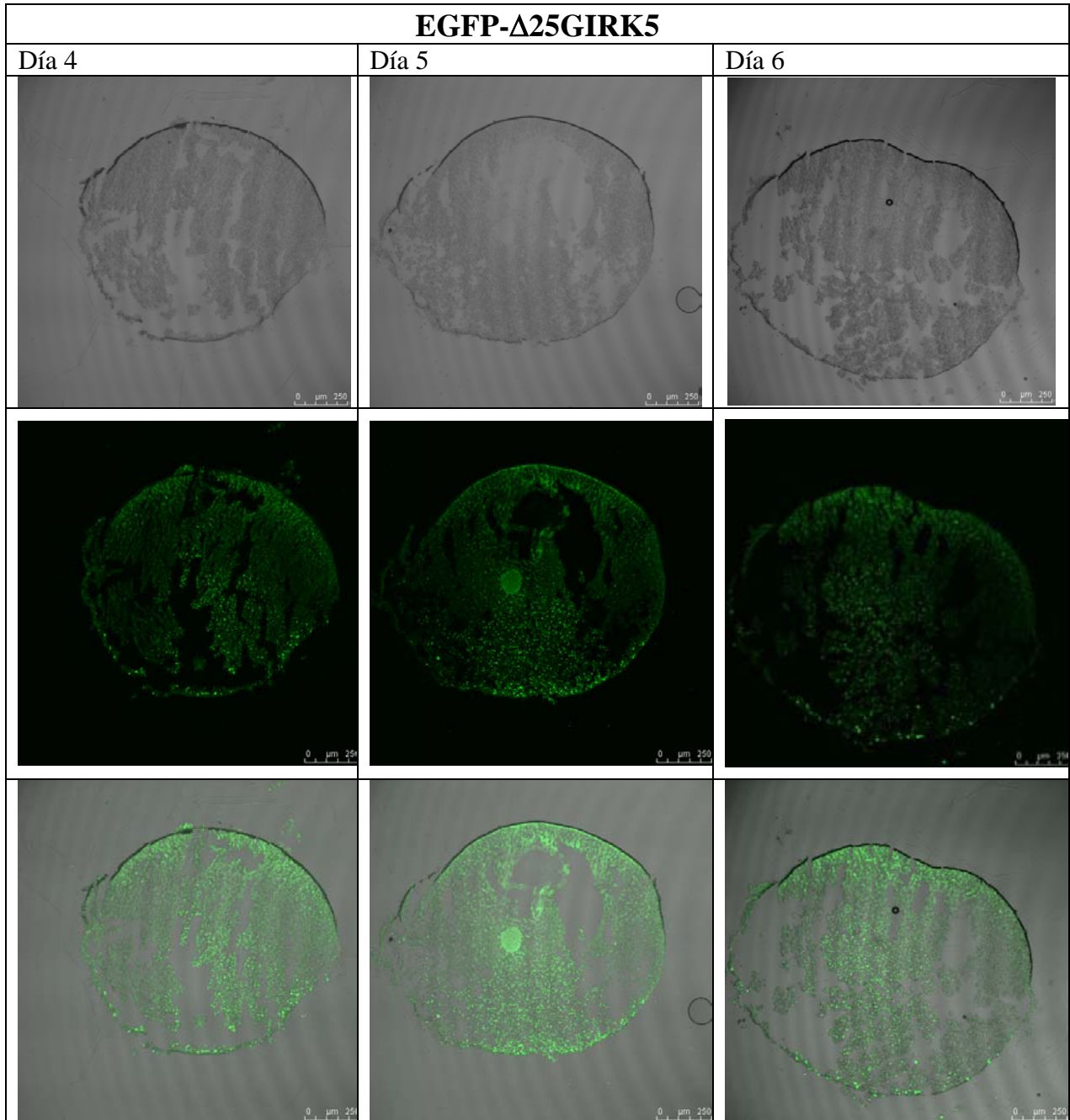
FIGURA 18. *Imágenes de microscopía confocal para EGFP-GIRK5.* Día 6 de expresión, la equivalencia del tamaño de la barra inferior se indica en la parte superior de cada columna.



EGFP- Δ 25GIRK5

En esta figura puede notarse que la quimera que lleva al canal Δ 25GIRK5 está distribuida tanto en el polo animal como en el vegetal. Estos resultados, indican que la isoforma del canal sin el motivo EXXXLI no tiene una distribución preferente en el ovocito en ninguno de los tres días de expresión estudiados. En la imagen del 5° día se observa una ligera acumulación casi en el centro, sin embargo estos resultados son insuficientes para poder definir qué es.

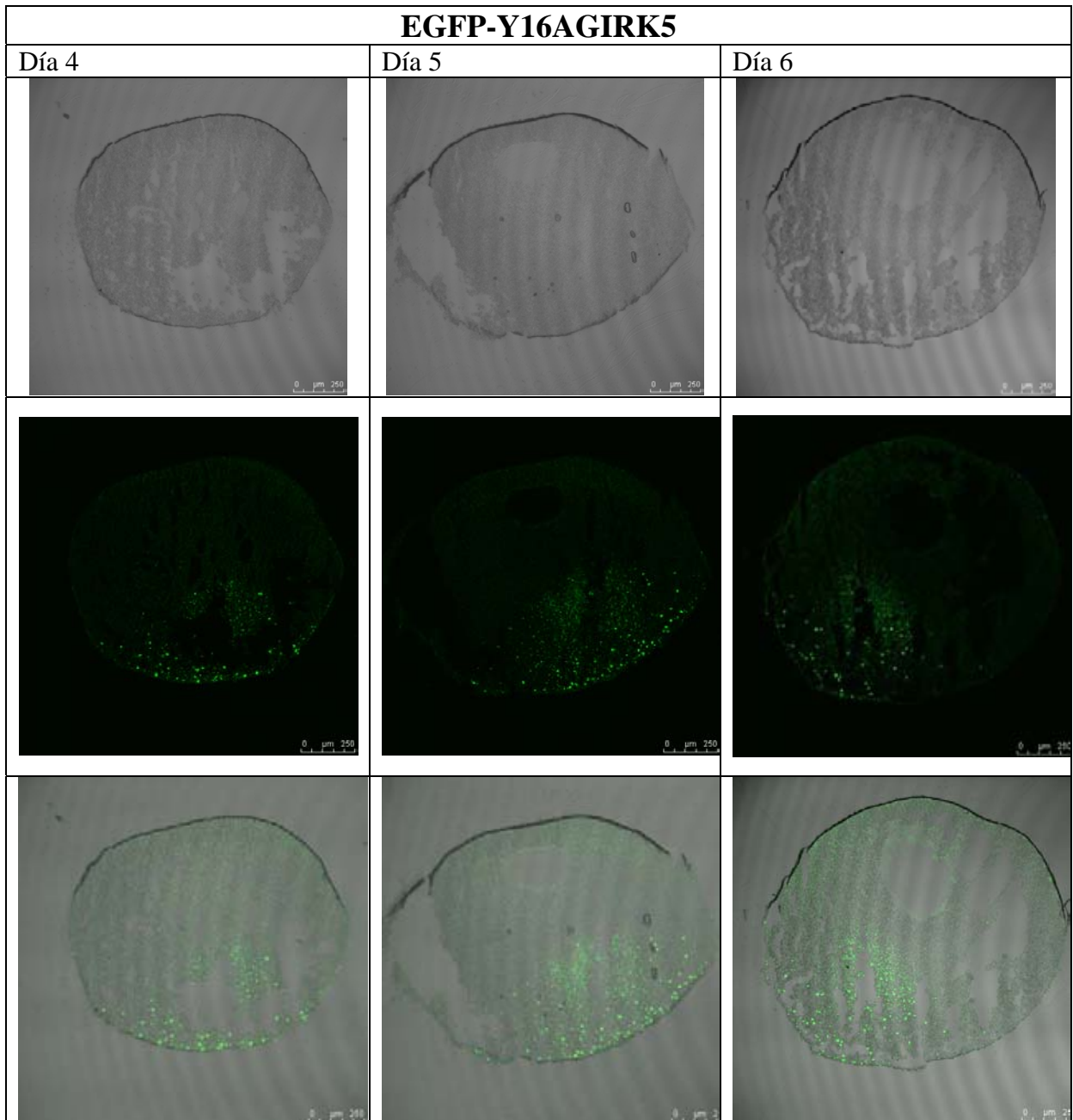
FIGURA 19. Imágenes de microscopía confocal para EGFP- Δ 25GIRK5. La barra inferior equivale a 250 μ m, lo que indica que el tamaño completo aproximado del ovocito es de 1.0 a 1.3 mm.



EGFP-Y16AGIRK5

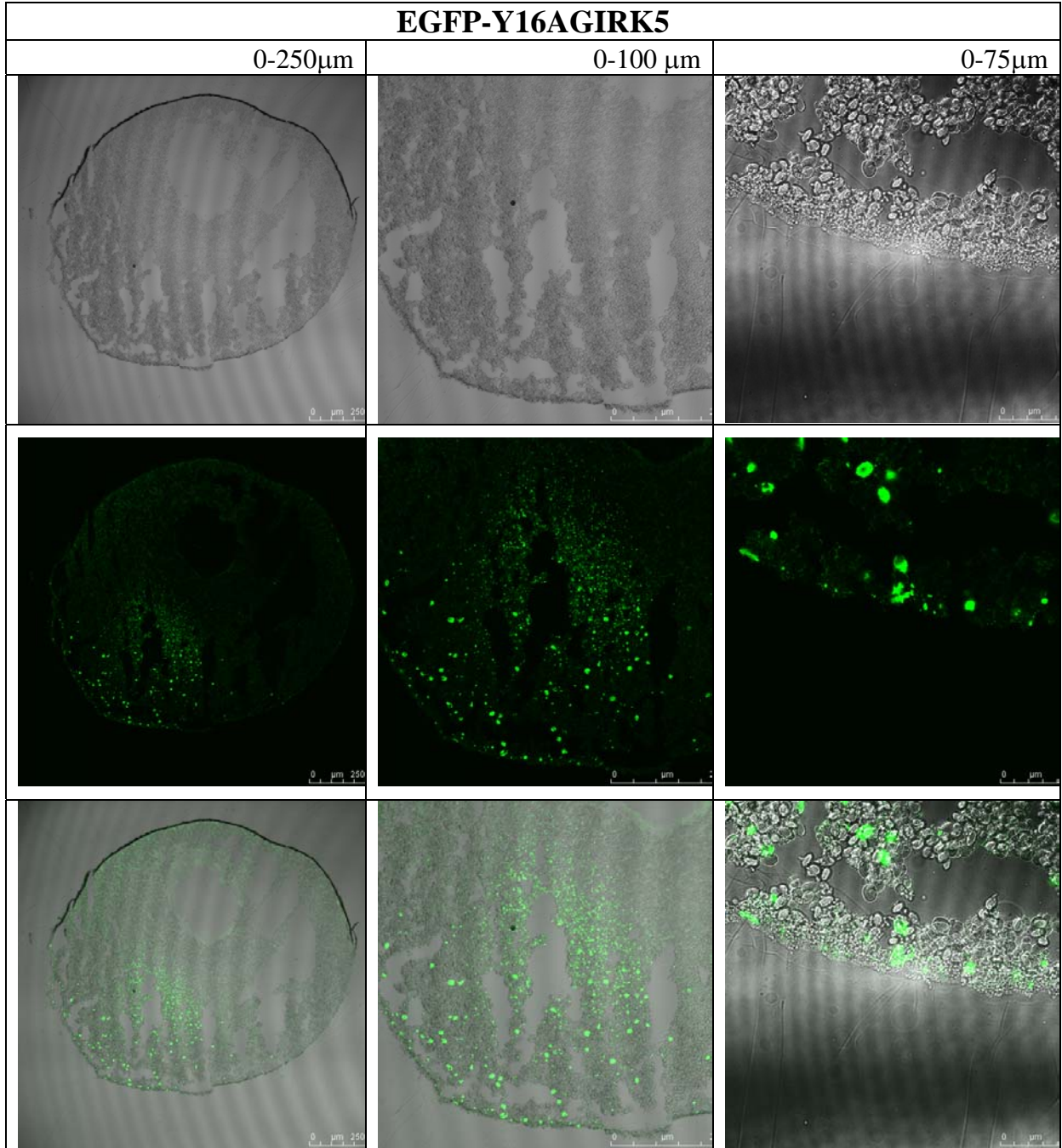
Esta quimera contiene el canal GIRK5 con la mutación puntual de un residuo de tirosina a alanina, para que no pueda ser fosforilada ni retenida como sucede con el canal completo. Por consiguiente, el motivo de localización basolateral ejerce su papel: las imágenes muestran que independientemente del día, la proteína se encuentra localizada en el polo vegetal de los ovocitos. Estos resultados demuestran la distribución preferencial y polarizada del canal GIRK5 debida al motivo EXXXLI del NH₂-terminal. Las imágenes corresponden a distintos cortes en los distintos días de estudio.

FIGURA 20. *Imágenes de microscopía confocal para EGFP-Y16AGIRK5.* La barra inferior equivale a 250 μ m.



La figura 21 muestra imágenes con aumento del corte correspondiente al 6° día para la proteína EGFP-Y16AGIRK5, donde se observan las vesículas que contienen a la proteína y que están cercanas a la membrana plasmática del polo vegetal.

FIGURA 21. *Imágenes de microscopía confocal para EGFP-Y16AGIRK5.* El tamaño de la barra inferior se indica en la parte superior de cada columna.



La expresión de las proteínas quiméricas permitió comprobar por microscopía confocal que existe una distribución diferente de las proteínas dependiendo de su secuencia. La quimera con $\Delta 25$ GIRK5 se encontró con una distribución uniforme sobre toda la superficie del ovocito, la de GIRK5 se mantiene retenida en una estructura subcelular y la de Y16AGIRK5 se encuentra polarizada. Cabe mencionar que en otros estudios se ha demostrado que la expresión de la proteína verde fluorescente se encuentra dispersa dentro del ovocito (Aydar y Palmer, 2006).

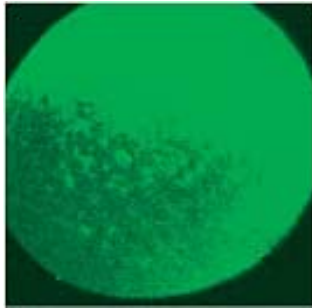


FIGURA 15. Distribución de la proteína GFP en ovocitos de *X. laevis*
Modificado de Aydar y Palmer, 2006

En el ovocito puede observarse una polaridad en la pigmentación que tan sólo es un reflejo extrínseco de una polaridad interna mucho más compleja a un nivel subcelular y molecular. Como se mencionó anteriormente, la disposición de los organelos del ovocito está polarizada, y a nivel molecular se observa por diferentes distribuciones de RNAs y proteínas localizados en un polo u otro. Como no existen indicios de señales externas que determinen la polaridad, se considera que su desarrollo es una propiedad autónoma e intrínseca del ovocito (Kloc *et al*, 2001).

Ahora se conoce que el fenómeno de RNAs localizados es común para organismos evolutivamente distantes tales como levaduras y vertebrados. Esto sugiere que la localización del RNA representa una estrategia ancestral altamente conservada y evolucionada que permite a la célula producir asimetrías locales en ciertos subdominios del citoplasma (King *et al*, 2005).

En la mayoría de los vertebrados e invertebrados, el propio desarrollo del embrión depende de esta distribución asimétrica de RNA materno y proteínas en el citoplasma. Sin embargo, el proceso de localización diferencial del RNA en el ovocito no es instantáneo y ocurre durante su largo periodo de diferenciación y desarrollo, acompañado por la elaboración de la polaridad (Kloc *et al*, 2001; King *et al*, 2005).

4.4 Papel de los canales GIRK5 en la formación de la vesícula de rompimiento.

El proceso de ovogénesis requiere aproximadamente de 8 meses y, finalmente, al igual que muchos vertebrados, los ovocitos de *Xenopus* permanecen fisiológicamente arrestados en la fase G2, antes de la primera profase meiótica (Weber, 1999). Una poza endógena de proteínas G $\beta\gamma$ actúa como inhibidor de la maduración y mantiene de forma constitutiva el estado arrestado del ovocito (Lutz *et al*, 2000). El inicio de la maduración comienza con la acción de la progesterona segregada por el folículo del ovocito, permitiendo la entrada a meiosis II que se observa con la formación de la vesícula de rompimiento (GVBD, germinal vesicle breakdown) (Weber, 1999).

De manera preliminar se realizó un ensayo donde se inyectó el RNA de los canales GIRK5 y $\Delta 25$ GIRK5 a ovocitos que se incubaron en una solución con progesterona 50 nM. Después de 48 horas se contaron los que tenían la GVBD y se obtuvieron los resultados siguientes:

Muestra inyectada	Sin progesterona (n=20)		Con progesterona (n=20)	
	# ovocitos con GVBD	% de ovocitos con GVBD	# ovocitos con GVBD	% de ovocitos con GVBD
Agua	0	0	1	5
GIRK5	0	0	1	5
$\Delta 25$ GIRK5	0	0	15	75

Donde n = 20 significa que se utilizaron 20 ovocitos por cada muestra.

En estos resultados se aprecia claramente un efecto de la progesterona sobre los ovocitos inyectados con $\Delta 25$ GIRK5. Una explicación de este efecto puede ser que como esta isoforma se expresa funcionalmente en la membrana plasmática necesita de proteínas G $\beta\gamma$, entonces, los canales disminuirían la cantidad de proteínas G $\beta\gamma$ libres y permitirían la acción de la progesterona para reanudar el ciclo celular con la subsecuente formación de la GVBD, sin embargo la presencia de canales debería ser muy alta para poder disminuir significativamente la cantidad de G $\beta\gamma$ libres. Otra hipótesis sería que los canales GIRK5 además hiperpolarizan a la membrana y que este valor de voltaje ($E_K \sim -90$ mV) también es crucial para el efecto de la progesterona.

Estos resultados sugieren que los canales GIRK5 participan en el proceso de maduración y /o fertilización de los ovocitos de *X. laevis* en una forma desconocida hasta el momento. De ser así, la distribución polarizada de este canal facilitaría el cumplimiento de dicho papel funcional.

La mayoría de los tipos celulares en organismos multicelulares están polarizados y encaran dos ambientes diferentes. Por ejemplo, las células epiteliales miran hacia el exterior o el lumen de un órgano por un lado y hacia el ambiente intersticial por el otro. Estas células muestran asimetrías funcionales y estructurales en su membrana apical y basolateral que son esenciales para su función. La polaridad de las células epiteliales depende de la localización de las proteínas de las membranas apicales y basolaterales (Sharma *et al*, 2006).

Los principales tipos de células polarizadas son los epitelios y las neuronas. La generación de la polaridad ocurre en dos pasos para las células epiteliales de mamífero, primero se forman las uniones adherentes entre células y después, en el lado apical de cada célula comienzan a formarse uniones estrechas, que actúan como barrera evitando que los componentes de una membrana se mezclen con la otra. En las neuronas la polaridad comienza con la extensión del axón hasta un punto dado y entonces ocurren una serie de cambios para inducir especializaciones presinápticas y postsinápticas. Por otra parte, las cascadas de señalización coordinan la organización del citoesqueleto y regulan la endocitosis y dinámica del tráfico de proteínas requerido para un circuito sináptico (Solecki *et al*, 2006).

El estudio de proteínas polarizadas es un campo emergente, por lo tanto no se cuenta con mucha información al respecto. Como ejemplos de proteínas con distribución asimétrica en células polarizadas se tienen a la syntaxina-3 que tiene un motivo de localización apical y está involucrado en las vías de tráfico para fusión de proteínas en la membrana plasmática apical (Sharma *et al*, 2006); las proteínas PAR (partitioning defective) intervienen en la división asimétrica de neuroblastos en *Drosophila*, sus homólogos mamíferos forman un complejo proteico que se localiza en el dominio apical de las células y en *Caenorhabditis elegans* intervienen en la polaridad de sus cigotos (Solecki *et al*, 2006).

Sobre canales iónicos polarizados la información es aún más escasa, un ejemplo es el canal CLIC I, un canal de cloro distribuido en distintos tipos celulares cuya función no ha sido determinada, pero se sabe que interviene en el proceso de reciclaje de la membrana apical en los epitelios (Ulmasov *et al*, 2007).

El direccionamiento polarizado de estas proteínas está determinado por motivos presentes en sus secuencias de aminoácidos. En 1994 el grupo de Kart Matter determinó que el transporte basolateral y la endocitosis dependía de un motivo común de tirosina o dileucina y además que los aminoácidos adyacentes en estos motivos determinan si el motivo favorece la endocitosis, la localización basolateral o ambas. Sus estudios se realizaron con proteínas LDL y receptores Fc en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, células derivadas del túbulo proximal de riñón de perro). Además de observar el efecto de las dos leucinas, se demostró que la presencia de uno a tres residuos de aminoácidos ácidos es importante para la localización basolateral más que para la endocitosis. Sin embargo, el receptor de la fracción Fc IgG presente en los macrófagos de ratón tiene un motivo dileucina que origina la localización basolateral y la endocitosis del receptor en células MDCK (Matter *et al*, 1994, Hunziker y Fumey, 1994).

Otro tipo de proteínas que presentan este motivo dileucina son: E-caderina, la proteína mayoritaria presente en las unión adherentes de células epiteliales, con una función importante en las uniones célula-célula y la polaridad células, donde el motivo la dirige hacia la superficie basolateral en células MDCK (Miranda *et al*, 2001); la acuaporina-3, este es un canal de agua presente en células de los túbulos colectores del epitelio renal, cuya localización basolateral depende de un motivo dileucina en combinación con un motivo de tirosina (Rai *et al*, 2006).

Los canales GIRK tienen un papel importante regulando la excitabilidad del ritmo cardíaco y de muchas regiones del cerebro, a través de la activación de varios receptores acoplados a proteínas G como los receptores opioides, cannabinoides y dopaminérgicos. Recientes descubrimientos sobre las implicaciones de los canales GIRK han demostrado que pueden ser inhibidos por cocaína y algunos antidepresivos (tioridazina, haloperidol, clozapina), y activados directamente por etanol, opioides, cannabinoides y cocaína, e incluso se promueven como los sitios blanco de los inhibidores de la recaptura de serotonina (SSRI),

utilizados para el tratamiento de la depresión, como fluoxetina (Prozac®). Se ha visto que la función de los canales GIRK está involucrada en atacar la susceptibilidad y antinocicepción por opioides, cannabinoides o etanol. Por lo tanto, los moduladores de los canales GIRK pueden ser agentes potenciales para tratar a los consumidores de drogas adictivas, al igual que para el tratamiento de la epilepsia y el dolor (Kobayashi *et al*, 2004).

5. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra por primera vez:

- La localización asimétrica generada por un motivo de dileucina de un canal iónico.
- Que el motivo de internalización o de localización EXXXLI esta acotado por una tirosina fosforilable.

6. PERSPECTIVAS

- Identificar el organelo donde se encuentra retenido el canal GIRK5 mediante el uso de marcadores específicos.
- Comprobar por medio de mutaciones puntuales de las leucinas y el ácido glutámico, ligadas con la EGFP, si la secuencia EXXXLI es el motivo que lleva a cabo la polarización del canal.
- Se sabe que la fosforilación de dos tirosinas del NH₂-terminal de los canales GIRK1 y GIRK4 inhibe su actividad (Rogalski *et al*, 2002). Por consiguiente, sería importante estudiar si su inhibición se debe a la internalización de los canales en el cerebro y en el nodo sinoauricular del corazón.

7. REFERENCIAS

1. Aidley, D.J. y Stanfield, P.R. Ion channels molecules in action, 2nd edition. Cambridge University Press, UK (1998). pp 307.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edition. Garland science. USA (2002). pp 583-656.
3. Aydar, E. y Palmer, C. Expression and functional characterization of the human ether-à-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel cardiac splice variant in *Xenopus laevis* oocytes. (2006). J. Membr. Biol. 211(2):115-126.
4. Barish, M.E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. J. Physiol. 342:309-325.
5. Bauer, C.K., Falk, T. y Schwarz, J.R. (1996). An endogenous inactivating inward rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. Pflugers Arch. 432:812-820.
6. Bianchi, L., Roy, M.L., Tagliatalata, M., Lundgren, D.W., Brown, A.M. y Ficker, E. (1996). Regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL-cells. J. Biol. Chem. 271:6114-6121.
7. Bichet, D., Haass, F.A. y Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁽⁺⁾ channels. Nat. Rev. Neurosci. 4:957-967
8. Biggin, P.C., Roosild, T. y Choe, S. (2000). Potassium channel structure: domain by domain. Curr. Opin. Struct. Biol. 10:456-461.
9. Bonifacino, J.S., y Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. Annu. Rev. Biochem. 72:395-447.
10. Corey, S. y Clapham, D.E. (1998). Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ (GIRK4) channel homomultimers. J. Biol. Chem. 273:27499-27504.
11. Dhar, M.S. y Plummer, H.K. (2006). Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. BMC Physiol. 6:8.
12. Doupnik, C.A., Davidson, N. y Lester, H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. Curr. Opin. Neurobiol. 5:268-277.
13. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E., Covarriubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M.L., Grissmer, S., Jan, L.Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H.A., McKinnon, D., Nichols, C.G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M.M., Vandenberg, C.A., Wei, A., Wulff, H. y Wymore, R.S. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage gated ion channels: potassium channels. Pharmacol. Rev. 55:583-586.
14. Hagiwara, S., y Takahashi, K. (1974). The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. J. Membr. Biol. 18:61-80
15. Hedin, K.E., Lim, N.F., y Clapham, D.E. (1996) Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of I K_{ACh} currents in oocytes. Neuron. 16:423-429.
16. Heginbotham, L. y MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. Science. 258:1152-1155.
17. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes. 2nd edition Sinauer, Sunderland, Mass., USA (1992). pp 207.
18. <http://tremedica.org/>
19. http://webpages.ull.es/users/bioquibi/metabolismo/archivostemas/tema%2012_pdf/Transporte_II.pdf
20. <http://www1.gelifesciences.com/>
21. Hunziker, W. y Fumey, C. (1994). A dileucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. EMBO J. 13:2963-2969.
22. Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar- Bryan, L., Seino, S. y Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. Science. 270:1166-1170.
23. Inanobe, A., Horio, Y., Fujita, A., Tanemoto, M., Hibino, H., Inageda, K. y Karachi Y. (1999). Molecular cloning and characterization

- of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J. Physiol.* 521:19-30.
24. Jelacic, T.M., Sims, S.M. y Clapham, D.E. (1999). Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. *J. Membr. Biol.* 169:123-129.
 25. Karschin, C., Dissmann, E., Stuhmer, W. y Karschin, A. (1997). IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 16:3559-3570.
 26. Kennedy, M.E., Nemeč, J., Corey, S., Wickman, K. y Clapham, D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274:2571-2582.
 27. King ML, Messitt TJ, Mowry KL. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol. Cell.* 97:19-33.
 28. Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A.P., Allen, L.H., Zearfoss, N.R. y Etkin, L.D. (2001). RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol.* 203:63-91.
 29. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. (2004). Modulators of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels: potentially therapeutic agents for addictive drug users. *Ann. NY Acad. Sci.* 1025:590-594.
 30. Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺ channel proteins. *Nature.* 74:135-141.
 31. Kubo, Y., Baldwin, T. J. Jan, Y. N. y Jan L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier K channel. *Nature.* 362:127-133.
 32. Kuo A., Domene C., Johnson L, Doyle D., and Vénien-Bryan C. (2005). Two Different Conformational States of the KirBac3.1 Potassium Channel Revealed by Electron Crystallography. *Structure.* 13: 1463-1472
 33. Lesage, F., Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M. y Hugnot, J.P. (1994). Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Lett.* 353:37-42.
 34. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. y Barhanin J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol. Chem.* 271:4183-4187.
 35. Letourneur, F. y Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* 69:1143-57.
 36. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J.E. *Biología celular y molecular.* 4ª edición. Editorial Panamericana S.A., Madrid España (2000). pp 1784, 675-706.
 37. Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.* 189:239-242.
 38. Lopatin, A.N., Makhina, E.N. y Nichols, C.G: (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature.* 372:366-369.
 39. Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.C. y Guggino, W.B. (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 57:1117-1123
 40. Lutz. L.B., Kim, B., Jahani, D. y Hammes, S.R. (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 275:41512-41520.
 41. MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555:62-65.
 42. Matsuda, H. y Sperelakis, N. (1993). Inwardly rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 265:H1107-111.
 43. Matter, K., Yamamoto, E.M. y Mellman I. (1994). Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 126(4):991-1004.
 44. Miledi, R. (1982). A calcium dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* 215:491-197.

-
-
45. Miledi, R., Parker, I. y Sumikawa, K. (1982). Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO* 1: 1307-1312.
46. Miranda, K.C., Khromykh, T., Christy, P., Le, T.L., Gottardi, C.J., Yap, A.S., Stow, J.L. y Teasdale, R.D. (2001). A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276:22565-22572.
47. Mora, S.I. y Escobar, L.I. (2005) Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett.* 579:3019-3023.
48. Nichols, C.G. y Lopatin, A.N. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171-91.
49. Plummer, H.K., Yu, Q., Cakir, Y. y Schuller, H.M. (2004). Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. *BMC Cancer.* 4:93.
50. Rai, T., Sasaki, S. y Uchida, S. (2006). Polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an NH₂-terminal sorting signal. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290:C298-304.
51. Rogalski, S.L., Appleyard, S.M., Pattillo, A., Terman, G.W. y Chavkin, C. (2000). TrkB activation by brain-derived neurotrophic factor inhibits the G protein-gated inward rectifier Kir3 by tyrosine phosphorylation of the channel. *J. Biol. Chem.* 275:25082-25088.
52. Ruppersberg, J.P., Schöter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. y Pongs, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature.* 345:535-537.
53. Ruppersberg, J.P. (2000). Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch.* 441:1-11.
54. Salvador, C., Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G. y Escobar, L.I. (2001). Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:135-147.
55. Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual.* Book 3, 2nd edition. Cold Spring Harbor laboratory press, USA, (1989).
56. Shankar, H., Kahner, B.N., Prabhakar, J., Lakhani, P., Kim, S. y Kunapuli, S.P. (2006). G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels regulate ADP-induced cPLA2 activity in platelets through Src family kinases. *Blood.*108:3027-3034.
57. Sharma, N., Low, S.H., Misra, S., Pallavi, B. y Weimbs, T. (2006). Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J. Cell. Biol.* 173:937-948
58. Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M. y Pfaffinger, P. (1993). Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron.* 11:67-76.
59. Solecki, D.J., Govek, E.E., Tomoda, T. y Hatten, M.E. (2006). Neuronal polarity in CNS development. *Genes Dev.* 19:2639-2647.
60. Standen, N.B. y Stanfield, P.R. (1978). A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J. Physiol.* 280:169-191.
61. Ulmasov B, Bruno J, Woost PG, Edwards JC. (2007). Tissue and subcellular distribution of CLIC1. *BMC. Cell. Biol.* 8:8.
62. van Vliet, C., Thomas, E.C., Merino-Trigo, A., Teasdale, R.D. y Gleeson, P.A. (2003). Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83(1):1-45.
63. Vargas, R., Botero, L., Lagos, L. y Camacho, M. (2004). *Bufo marinus* oocytes as a model for on channel protein expression and functional characterization for electrophysiological studies. *Cell Physiol. Biochem.* 14:197-202
64. Wang, Z.W., Kunkel, M.T., Wei, A., Butler, A. y Salkoff, L. (1999). Genomic organization of nematode 4TM K⁺ channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868:286-303.
65. Weber, W. (1999). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta.* 1421:213-233.
-
-

8. APÉNDICE

8.1 Metodología.

- Obtención *in vitro* de RNA.

Se lineariza el plásmido que contiene el DNA de interés utilizando lo correspondiente a 6 µg de DNA y 2 µL de la enzima de restricción Mlu-I para llegar a un volumen de reacción final de 20 µL. Se incuba durante 3 h a 37 °C y se comprueba posteriormente con 1 µL de la reacción anterior en un gel de agarosa al 1% que se haya linearizado el DNA; se adicionan 1 µL de EDTA 0.5 M, 2 µL de acetato de amonio y 44 µL de etanol 100%. Se mezcla bien e incuba toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente, se centrifuga a 14000 rpm a 4 °C durante 20 min y se recupera el precipitado retirando el exceso de etanol; una vez seco, resuspender en 6 µL de agua grado biología molecular y se comprueba con 1 µL la presencia de DNA en un gel de agarosa al 1%.

Una vez linearizado el DNA se realiza la reacción de transcripción, se mezclan 10 µL de nucleótidos trifosfatados (NTP/Cap) 2x, 2 µL de solución amortiguadora de reacción 10x, 5 µL de templado de DNA lineal, 2 µL de enzima SP6 RNA polimerasa y 1µL de GTP, e incuba a 37°C durante 3 h.

Se agrega 1µL de DNasa a la reacción anterior y se incuba 15 minutos a 37 °C para eliminar el DNA presente. Para detener la reacción y recuperar el RNA transcrito se adicionan 30 µL de agua libre de nucleasas y 25 µL de cloruro de litio y se deja precipitando a -20 °C durante toda la noche.

Finalmente, se centrifuga a 14000 rpm a 4 °C durante 20 min, se recupera el botón, éste se lava con 1mL de etanol al 70% y se centrifuga para eliminar todo el etanol. Se deja secar el botón durante 10 min y se resuspende el pellet en 20 µL de solución amortiguadora Tris-EDTA.

* *Cuantificación del RNA.*

La concentración del RNA se determina por espectrofotometría UV, se mezclan 2 µL del RNA recién preparado con 498 µL de agua destilada; se agita brevemente y se lee en celda de cuarzo a una longitud de onda de 260 nm. El espectrofotómetro se calibra con 500 µL de agua destilada.

-Réplica en Western.

1. Obtención de las fracciones membranales de los ovocitos de la rana *Xenopus*.

- Homogenizar los ovocitos en la solución de extracción con 2ml/ovocito.
- Centrifugar a 4000 g por 10 min a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa.
- Centrifugar a 4000 g por 10 min a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa.
- El botón contiene la fracción de membranas totales

2. Separación de las proteínas por electroforesis.

- La electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel SDS- poliacrilamida al 5% como concentrador y al 10% como separador.
- La fracción membranal de 2.5 ovocitos fue resuspendida en 10 µl de buffer de carga (SDS-gel loading buffer, Laemmli). La relación fue de 4 µl de buffer por ovocito.
- Las muestras fueron calentadas a 95 °C por 5 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido Full Range Rainbow (Amersham).
- Correr las muestras a 70 V hasta pasar el gel de concentración.
- Correr las muestras en el gel separador a 110 V.

3. Transferencia semihúmeda de las proteínas a membranas de PVDF.

- Humectar la membrana de PVDF en metanol absoluto.
- Remojar en la solución de transferencia el gel separador, la membrana de PVDF y los cojinetes por un lapso de 15 min.
- Hacer el sándwich especificado para la transferencia de proteínas siguiendo las especificaciones del Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad).
- Transferir las proteínas a 7 V por 1 h.
- Teñir el gel para comprobar la eficiencia de la transferencia.

4. Bloqueo de la membrana

- Incubar la membrana en una disolución de TBST con el agente bloqueador al 0.4% (Non- Fat Dry Milk, Bio-Rad) durante toda la noche a 4° C.
- Enjuagar una vez con TBST.

5. Incubación de la membrana con los anticuerpos.

- Incubar la membrana una h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-GFP en una dilución 1:1000 (monoclonal antibody JL-8, Clontech). El anticuerpo se diluyó en TBST con 0.2% del agente bloqueador.
- Enjuagar la membrana con TBST.
- Lavar la membrana con TBST 3 veces por 10 min a T° ambiente y agitación vigorosa
- Lavar la membrana con TBST a T° ambiente por 15 min con agitación vigorosa.
- Incubar la membrana una h a T° ambiente con el anticuerpo secundario HRP conjugado de cabra anti-ratón en una dilución 1:50000. El anticuerpo se diluyó en TBST con 0.2% del agente bloqueador.
- Lavar la membrana con TBST 3 veces por 10 min a T° ambiente y agitación vigorosa
- Lavar la membrana con TBST a T° ambiente por 15 min con agitación vigorosa.

5. Detección

- Revelar la membrana con el kit ECL Advance de Amersham siguiendo las instrucciones del proveedor.
- Exponer la membrana a la placa radiográfica
- Revelar y fijar la placa radiográfica.

-Microscopía confocal.

1. Fijación de los ovocitos
 - Sumergir los ovocitos en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS, mantener durante toda la noche a 4° C.
 - Cambiarlos a una solución de crioprotección con sacarosa al 30% y mantenerlos toda la noche a 4° C para que la solución se incluya por completo en los ovocitos, esto se comprueba cuando descienden al fondo del tubo que los contiene.
2. Obtención de los cortes.
 - Los ovocitos se cubren con Tissue-teck ® y se dejan en el crióstato hasta que éste mantenga una temperatura de -25° C.
 - Realizar cortes de 10 µm de espesor.
 - Colocarlos en portaobjetos gelatinizados.
 - Dejar secar al aire libre y en oscuridad durante 20 min.
 - Montar las muestras con Vectashield ®.
3. Microscopía confocal.
 - Los cortes se observan con objetivo 10X.
 - Se excita la muestra con una lámpara de argón con línea de emisión a 488nm y de detección a 508nm.
 - Las imágenes se capturan con el sistema de detección del microscopio confocal LEICA TCS PS5.

8.2 Formulación de soluciones.

Gel Agarosa 1% para ADN.

Agarosa 0.3 g

TBE1X 30 ml

Bromuro de etidio 1.4 µl

Solución amortiguadora TBE.

- Stock 1X (sol de trabajo)

- Tris base 89 mM

- Ácido bórico 89 mM

- EDTA 0.5 M pH 8.0 2 mM

Colorante para corrimiento en gel (ADN).

Azul de bromofenol 0.25%

Xileno cianol FF 0.25%

Glicerol en agua 30%

Guardar a 4° C.

Gel Agarosa ARN.

0.3g de agarosa en 30 ml de H₂O.

3 ml de MOPS 10X.

1.5 ml de formaldehído.

Nota: El formaldehído se tiene que añadir cuando el gel esté a ~50° C

MOPS 10X.

MOPS (libre de ácido) 41.86 g 0.4 M

Acetato de sodio 6.8 g 0.1 M

EDTA 0.5 M pH 8.0 20 ml 0.01 M

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

Solución amortiguadora de lisis.

Sacarosa 250 mM

EDTA 1 mM

TRIS 10 mM

Ajustar pH 7.6

Agregar 1 pastilla de inhibidores de proteasas a 10 ml de la sol de extracción (mini Complete, Roche)

Geles de acrilamida.

Gel concentrador, 5% acrilamida

H₂O 3.4 ml

30% acrilamida 830 µl

1 M Tris-HCl (pH 6.8) 630 µl

10 % SDS 50 µl

10% APS 50 µl

TEMED 5 µl

Gel separador, 10% acrilamida

H₂O 4.0 ml

30% acrilamida 3.3 ml

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml

10 % SDS 100 µl

10% APS 100 µl

TEMED 4 µl

Los valores reportados son para la preparación de dos geles.

*La mezcla de acrilamida:bisacrilamida tiene una relación molar de 29:1

Buffer de carga Laemmli.

Tris -HCl, pH 6.8 62.5 mM

Glicerol 25 %

SDS 2 %

Azul de bromofenol 0.01 %

β-mercaptoetanol 5%

Buffer de electroforesis Tris-glicina.

Tris base 25 mM

Glicina 250 mM

SDS 0.1 %

Nota; el pH normal de esta solución se encuentra alrededor de 8.0 a 8.5

Solución de transferencia.

Tris base 25 mM

Glicina 250 mM

SDS 0.1 %

Metanol 20 %

Nota; el pH normal de esta solución se encuentra alrededor de 8.0 a 8.5

Solución amortiguadora TBS.

NaCl 137 mM

Tris base 20 mM

Ajustar pH a 7.6

TBST: Para un litro de TBS agregar 1 ml de Tween 20

Medio ND96 pH= 7.5 con NaOH 1M

NaCl 96 mM

KCl₂ 2 mM

CaCl₂ 1.8 mM

MgCl₂ 1 mM

Piruvato de Na⁺ 2 mM

HEPES 5 mM

Solución amortiguadora de fosfatos PB, 0.2 M, pH=7.4

Solución A H₂NaPO₄·2H₂O 0.2M

Solución B Na₂HPO₄·7H₂O 0.2M

Mezclar 81mL sol A + 19mL sol B pH=7.4

PBS 0.02 M pH=7.4

PB 0.2M 100 mL

NaCl 8.76 g

KCl 0.2 g

H₂O cbp 1000 mL