

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

"EVALUACIÓN DEL VENENO DE ALACRÁN SOBRE EL CANAL DE POTASIO TASK-3 (4TM/2P)"

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ROXANA ISELA NORIEGA NAVARRO



TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS

2007



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los estudio de Maestría.

A la DGEP por el complemento de beca otorgado.

Al Dr. José de Jesús García Valdés

Por haberme introducido al tema, haberme permitido trabajar con él, la guía y conocimientos brindados a través de todo el proyecto en todo momento, su paciencia y amistad.

Al Dr. Abraham Landa Piedra Por la oportunidad que me brindó de aprender las técnicas de biología molecular.

A los miembros del H. Jurado Por sus observaciones y comentarios que hicieron que este trabajo se enriqueciera.

Al Dr. Possani Postay y a la Dra. Elizabeth Schwartz Por proporcionar las toxinas de alacrán para este proyecto.

A la Dra. Sobeida Sánchez, Dra. Laura Escobar y al Dr. Luis Vaca Por permitirme usar los equipos y trabajar en sus laboratorios.

DEDICATORIAS

A la UNAM

Mis padres: Guadalupe y Rigoberto

A mis hermanos: Laura y Roger

A Raul

A Lucha

A mi familia, amigos y compañeros...

ÍNDICE

LISTA

			_
		Abreviaturas	3
		Figuras	6
		Tablas	7
		Gráficas	7
	RES	SUMEN	9
	SUN	MARY	10
1	INTRO	DDUCCIÓN	11
	1.1	Canales iónicos	11
	1.2	Canales selectivos a potasio	13
	1.3	Canal de potasio TASK-3	14
	1.4	Toxinas de alacrán	18
	1.5	Ovocitos de Xenopus laevis	20
	1.6	Fijación de voltaje por dos electrodos (TEVC)	22
2.	ANTE	CEDENTES	24
2.1.	JUSTIE	FICACIÓN	26
2.2.	OBJET	IVOS	27
	2.2.1	Objetivo general	27
	2.2.2	Objetivos particulares	27
3.	MATE	RIALES Y MÉTODOS	28
	3.1	Clonación de TASK-3 de rata	28
	3.1.1	Extracción de ARN total (ARN _T)	28
	3.1.2	Obtención del ADN complementario (ADN _c)	29
	3.1.3	Amplificación del ADNc con oligonucleótidos específicos (PCR)	31
	3.1.4	Ligación	33
	3.1.5	Transformación y tamizaje de colonias	34
	3.1.6	Purificación del plásmido (miniprep)	35
	3.1.7	Secuenciación del fragmento clonado	37

	3.1.8 Purificación del plásmido a gran escala (maxiprep)	37
	3.2 Transcripción in vitro	38
	3.3 Extracción de los ovocitos	40
	3.4 Inyección del ARN _m	41
	3.5 Estudio electrofisiológico del canal TASK-3 de rata	41
	3.5.1 Expresión Heteróloga del ARN _m	42
	3.5.2 Caracterización del canal	42
	3.6 Efecto del veneno de alacrán sobre TASK-3	43
4.	RESULTADOS	45
	4.1 Clonación de TASK-3 de rata	45
	4.1.1 Extracción de ARN total (ARN _T)	45
	4.1.2 Obtención del ADN complementario para TASK-3 (RT-PCR)	46
	4.1.3 Identificación de clonas	46
	4.1.4 Secuenciación del fragmento clonado	48
	4.2 Transcripción in vitro	50
	4.3 Expresión Heteróloga del canal iónico TASK-3 de rata en ovocitos	51
	4.4 Caracterización del canal TASK-3	52
	4.4.1 Comportamiento "lavado de corriente"	52
	4.4.2 Efecto de la concentración de potasio	53
	4.4.3 Sensibilidad a la variación del pH externo	55
	4.4.4 Efecto bloqueador de la concentración de bario y rojo de rutenio	57
	4.5 Efecto del veneno de alacrán en el canal de potasio TASK-3	60
5.	DISCUSIÓN	66
	5.1 Clonación de TASK-3	66
	5.2 Expresión y caracterización de TASK-3	68
	5.3 Efecto del veneno de alacrán sobre TASK-3	70
6.	CONCLUSIONES	75
	PERSPECTIVAS	76
	BIBLIOGRAFÍA	77
	APÉNDICE	87

LISTA

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADN _c	Ácido desoxirribonucléico complementario
ARN	Ácido ribonucléico
ARN _m	Ácido ribonucléico mensajero
ARN _r	Ácido ribonucléico ribosomal
ARN _T	Ácido ribonucléico total
$[Ba^{2+}]_{e}$	Concentración externa de Ba ²⁺
BSA	albúmina de suero bovino
°C	grados centígrados
Cat.	Catálogo
cm	Centímetros
DEPC	dietil pirocarbonato
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
ddNTP	2',3'dideoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	dinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
Ε	Potencial
8	fuerza de gravedad
g	Gramos
h	Hora
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico
HPLC-RP	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
Ι	Corriente
I _{max}	corriente máxima
$[K^+]_e$	Concentración externa de potasio
kb	Kilobase

kDa	Kilodaltones
LB	Luria – Bertani
Μ	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
mV	Milivoltios
ΜΩ	Megaohms
μΑ	Microampers
μg	Microgramo
μL	Microlitro
n	número de muestras
NCBI	National Center Biotechnology Information
ng	Nanogramos
nL	Nanolitros
nm	Nanómetros
No.	Número
NTP/CAP	nucleótidos trifosfáto/caperuza
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pH _e	pH extracelular
R.A.	grado analítico
RT	Transcriptasa reversa
S	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOC	medio enriquecido de glucosa
t	Tiempo
TEVC	Fijación de voltaje con dos electrodos

U	Unidades de enzima
V	Volumen
V	Voltios
Nucleótidos	
a	Adenida
c	Citosina
g	Guanina
t	Timina
Aminoácidos	
A	Alanina
С	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
Н	Histidina
Ι	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
М	Metionina
Ν	Asparagina
Р	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
Т	Treonina
V	Valina
W	Triptófano
Y	Tirosina

FIGURAS

Intr	odu	cción

Figura 1.1	Canal iónico.								
Figura 1.2	Organización topográfica de la subunidad α de un canal de potasio								
	4TM/2P.								
Figura 1.3	Secuencia de nucleótidos y amino ácidos del canal TASK-3 (KCNK9)								
	de rata.								
Figura 1.4	Estructura terciaria de una toxina de alacrán para un canal de K^+								
	(caribdotoxina).								
Figura 1.5	Rana y ovocitos de la especie Xenopus laevis.								
Figura 1.6	Diagrama de la técnica fijación de voltaje por dos electrodos (TEVC).								
Materiales									
y Métodos									
Figura 3.1	Pasos para la síntesis de ADN _c .								
Figura 3.2	Vector TOPO TA.								
Resultados									
Figura 4.1	Integridad del ARN_T de cerebro de rata.								
Figura 4.2 Fragmento obtenido del PCR con oligonucleótidos específicos									
	TASK-3.								
Figura 4.3	Identificación de clonas con el fragmento TASK-3 de rata por PCR.								
Figura 4.4	Identificación de la clona con el fragmento TASK-3 de rata por digestión								
	con la enzima <i>Hind III</i> .								
Figura 4.5	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la región codificadora de la								
	clona de ADN _c de TASK-3 de rata.								
Figura 4.6	Producto de la reacción de linearización enzimática del plásmido.								
Figura 4.7	Producto de la reacción de transcripción in vitro con la T7 ARN								
	polimerasa.								
Figura 4.8	Expresión del ARN _m de TASK-3.								
Figura 4.9	Diferencia de las corrientes generadas variando $[K^+]_e$ a diferentes								
	potenciales.								
Figura 4.10	Sensibilidad de TASK-3 al pH externo.								

Figura 4.11	Inhibición de las corrientes de TASK-3 por $[Ba^{2+}]_e$ y $[RR]_e$.						
Figura 4.12	Cromatograma del veneno total de Centruroides limpidus limpidus por						
	exclusión molecular.						
Figura 4.13	Cromatograma de las fracciones puras de Opisthacanthus cayaporum						
	por HPLC-RP.						
Figura 4.14	Cromatograma de las fracciones puras de Hadrurus gertschi por HPLC-						
	RP.						
Discusión							
Figura 5.1	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos: clonada y reportada.						
Figura 5.2	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región del poro de						
	TASK-3 con otros canales de potasio.						

TABLAS

Materiales

y Métodos

Tabla 3.1	Componentes de la reacción de Transcripción Reversa.							
Tabla 3.2	Componentes de la reacción de PCR.							
Tabla 3.3	Programa térmico de la reacción de PCR.							
Tabla 3.4	Componentes de la reacción de ligación con TOPO TA.							
Tabla 3.5	Componentes de la reacción de ligación con Hind III.							
Tabla 3.6	Componentes de la reacción de digestión con BamH I.							
Tabla 3.7	Componentes de la reacción de transcripción.							
Resultados								
Tabla 4.1	Cantidad de ARN _T extraído del cerebro de rata.							

GRÁFICAS

Resultados

Gráfica 4.1 Disminución en la corriente de TASK-3 por el fenómeno de lavado de corriente.

- **Gráfica 4.2** Selectividad del canal TASK-3 a los iones K⁺.
- **Gráfica 4.3** Dependencia de la corriente de TASK-3 a la $[K^+]_{e.}$
- **Gráfica 4.4** Sensibilidad de TASK-3 al pH externo.
- **Gráfica 4.5** Dependencia de la corriente de TASK-3 al pH_e.
- **Gráfica 4.6** El efecto del pH_e sobre las corrientes de TASK-3 es independiente del voltaje.
- **Gráfica 4.7** Sensibilidad de TASK-3 a $[Ba^{2+}]_e y [RR]_e$.
- **Gráficas 4.8** Dependencia de la corriente de TASK-3 a $[Ba^{2+}]_e$ y $[RR]_e$.
- **Gráficas 4.9** El efecto de $[Ba^{2+}]_e$ y $[RR]_e$ sobre las corrientes de TASK-3 es independiente del voltaje.
- **Gráfica 4.10** La corriente de TASK-3 es resistente a la fracción I del veneno de *Centruroides limpidus limpidus*.
- **Graficas 4.11** La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones (II-IV) del veneno de *Centruroides limpidus limpidus*.
- **Gráficas 4.12** La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones puras (I-IV) del veneno de *Opisthacanthus cayaporum*.
- **Gráficas 4.13** La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones (I-XIV) del veneno de *Hadrurus gertschi*.

RESÚMEN

El canal iónico TASK-3 pertenece a una familia no muy estudiada de canales de potasio con cuatro segmentos transmembranales y dos segmentos formadores del poro (4TM/2P), el cual se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tejidos, principalmente en cerebro. Se ha encontrado a este canal sobreexpresado en algunas células cancerígenas y en contraste, también está involucrado con la muerte celular programada o apoptosis. Hasta la fecha no se ha encontrado ningún bloqueador o activador específico para este tipo de canales. Este trabajo constituye la primera etapa de un proyecto para investigar las interacciones entre un poro de canales de potasio asimétrico y neuropéptidos del veneno de animales ponzoñosos. Para tal se probó el efecto del veneno de alacrán sobre el canal TASK-3 de rata con el fin de encontrar ligandos específicos. Primero, se realizó la clonación del canal TASK-3 de rata por lo que se extrajo el ARN total del cerebro, a partir del cual se logró obtener el ADN complementario, que fue amplificado utilizando la técnica de PCR¹ empleando oligonucleótidos específicos. Posteriormente se clonó en el vector TOPO TA. Una vez que se verificó la integridad de la secuencia, se llevó a cabo la reacción de transcripción y el ARN obtenido se expresó heterólogamente en ovocitos de Xenopus laevis. El canal se caracterizó empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC), usando diferentes medios fisiológicos, variando la concentración de potasio, protones, bario y rojo de rutenio; se observó que estos tres últimos son inhibidores del canal. Al parecer TASK-3 tiene un ligero comportamiento denominado "lavado de corriente", ya que el valor de la corriente disminuyó lentamente con el transcurso del tiempo. Finalmente, sobre la función del canal TASK-3 expresado en ovocitos, se probó el efecto de 22 fracciones del veneno de tres especies de alacranes (Centruroides limpidus limpidus, Hadrurus gertschi, Opisthacanthus cayaporum). Estas fracciones no presentaron ningún efecto bloqueador o activador sobre este canal.

¹ Mullis y Faloona., 1987.

SUMMARY

Ionic channel TASK-3 belongs to the recent studied class of K⁺ channels with 4 transmembrane domains and 2 pore domains (4TM/2P) which is widely distributed in different tissues, mostly in brain. TASK-3 has been found over-expressed in some carcinogenic cells; however it is also involved in programmed cellular death or apoptosis. To date, it has not been found any blocking or specific activator for this channel. This work constitutes the first stage of a project to find out the interactions between an asymmetric pore and neuropeptids from the venoms of diverse poisonous animals. Thus, scorpion venoms were tested on rat channel TASK-3 with the purpose of finding specific ligands. Brain total RNA was extracted, subsequently was obtained the complementary DNA (DNA_c) that was amplified by the technique of PCR² using specific primers. Once the sequence was completely verified the *invitro* transcription reaction was carried out and the ARN was heterologously expressed in oocytes of Xenopus laevis. The channel current characterization was made using the two electrode voltage clamp (TEVC) technique, in physiological medium, at different concentration of potassium, proton, barium and ruthenium red. The last three are channel inhibitors. It seems that TASK-3 has a slightly "run down" behavior, since the current value decreased slowly with the course of the time. Finally, 22 fractions were tested, but they did not present any blocker or activator effect on this channel.

² Mullis y Faloona, 1987.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de iones a través de ésta. Se encuentran presentes en todas las células de animales, plantas y microorganismos. Están involucrados en muchas funciones biológicas importantes como la señalización en el sistema nervioso y muscular, procesos osmóticos, regulación metabólica, secreción de hormonas y neurotransmisores, traducción sensorial, transporte transepitelial, regulación de la presión sanguínea, proliferación celular, expresión de genes, tono vascular, excitabilidad cardiaca, respuestas del sistema inmune, proceso de aprendizaje y memoria, entre otras (Friederich, 2003; Herrera, 1996).

El flujo de las corrientes iónicas a través de membranas celulares está determinado por tres factores: el potencial de membrana, la composición electrolítica de los fluidos extra e intracelular y el tipo de canales iónicos presentes en las células. La diferencia en composición electrolítica entre estos fluidos determina la fuerza electroquímica impuesta a un ión particular por el potencial de membrana. Los canales iónicos responden a cambios en el potencial de membrana o en la concentración de alguna molécula, y alteran su configuración tridimensional de un estado de no conducción a un estado conformacional que permite el paso de las corrientes iónicas (Friederich, 2003) (**figura 1.1**).



Figura 1.1 Canal iónico. A) Estado abierto: conducción de iones, B) Estado cerrado: no conducción, C) Estado inactivado: no conducción¹.

¹ Figura tomada y modificada de Hwww.uam.es/docencia_red/qo/l7/recon.htmlH

Los canales forman poros acuosos estrechos bien definidos que para funcionar adecuadamente deben convertirse en excelentes receptores moleculares: 1) para detectar diferentes señales biológicas en el ambiente y responder rápidamente cambiando del estado cerrado al abierto y viceversa; 2) en la adaptación del estado abierto conductor para discriminar entre diferentes iones inorgánicos con el fin de conducir al ión correcto (Miller, 2000). Los canales iónicos controlan el flujo de los iones, manteniendo abiertos o cerrados los conductos para los mismos, lo que presumiblemente realizan mediante cambios de conformación. Según el tipo de factores que los activan, se distinguen tres clases de canales:

1.- Mecanosensibles: se abren en respuesta a una acción mecánica aplicada a la membrana, incrementando su volumen.

2.- Operados por receptor: son estructuras que permiten el paso de iones de un lado a otro de la membrana, después de que un ligando (agonista) se ha unido a su receptor específico de membrana. El receptor puede formar parte de la estructura proteínica o ser una molécula distinta al canal.

3.- Dependientes de voltaje, poseen un sensor de voltaje de modo que el canal se abre o se cierra en respuesta a cambios en el potencial de membrana, característico para cada canal.

Una de las propiedades de los canales iónicos de mayor relevancia fisiológica es su selectividad, permitiendo que puedan pasar algunos iones y otros no. Los iones que han de ser transportados tienen que deshacerse de la mayoría o de todas las moléculas de agua asociadas para pasar, dependiendo fundamentalmente del diámetro del conducto y de la naturaleza de los grupos químicos que le configuran en la zona más estrecha del canal, lo que se conoce como filtro de selectividad, limitando su velocidad de paso (Alberts, 2002).

Los flujos de iones a través de canales a favor de los gradientes de potencial electroquímico son muy rápidos (10^6 a 10^7 iones/s) y eficientes (error ~ 0.1%) (Cooper y Jan, 1999; Minor, 2001). Además, existen fenómenos de saturación, competición e inhibición específica (Herrera, 1996). Existen cuatro familias de canales agrupadas de acuerdo a la selectividad iónica que presentan: Na⁺, K⁺, Ca⁺ y Cl⁻.

12

1. 2 CANALES SELECTIVOS A POTASIO

Los canales selectivos a potasio (K⁺) se encuentran tanto en células eucariotes como procariotes. Su excepcional diversidad funcional los hace idealmente apropiados para realizar una gran variedad de procesos biológicos virtualmente en todas las células vivas (Rudy, 1998). En células excitables, los canales de K⁺ establecen el potencial de reposo por la permeabilidad a iones K⁺. Tienen la particularidad de abrirse rápidamente en un amplio intervalo de potenciales de membrana (Lesage *et al.*, 1996a); por lo que influyen en el potencial de acción en una variedad de formas, jugando un papel fundamental en la integración neuronal, contracción muscular y secreción hormonal. En células no excitables, su expresión parece estar correlacionada con estados específicos del desarrollo celular (Barres *et al.*, 1990; Lewis y Cahalan, 1995). Se pueden clasificar de acuerdo a la topología de segmentos transmembranales que presenta la subunidad α formadora del poro; por lo que son agrupados dentro de cuatro principales clases de estructuras presentando 2, 4, 6 u 8 regiones transmembranales (TM) y 1 ó 2 dominios conservados formadores del poro (P), esenciales para permitir la selectividad al ión K⁺ (Chapman *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000).

Se han identificado canales de potasio con cuatro dominios transmembranales (TM_1-TM_4) y dos dominios formadores del poro (P_1, P_2) (**Figura 1.2**) representando la subunidad α , que al dimerizar forman el poro selectivo a iones K⁺ (Chapman *et al.*, 2000, Rajan *et al.*, 2000).



Figura 1.2 Organización topográfica de una subunidad α de un canal de potasio 4TM/2P².

² Figura tomada y modificada de Swartz, 2004.

Los canales de K⁺ 4TM/2P se encuentran distribuidos en varios tejidos v generalmente entre ellos muestran menos del 30% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Kim et al., 2000). Estos han sido exitosamente expresados en sistemas heterólogos, observándose un comportamiento de activación rápida con corrientes rectificadoras débiles selectivas a K⁺, sensibles al voltaje de activación y contribuyendo a las corrientes basales ya que fijan el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio del K^+ (Rajan *et al.*, 2000). Hasta la fecha existen dieciséis miembros de esta familia conocidos como KCNK (Holt et al., 2006). El primer miembro de la familia caracterizado se conoce como TWIK-1 (KCNK1) por sus siglas en inglés (Tandem of P domains in a Weak Inwark rectifying \mathbf{K}^+ channel), y es un canal rectificador entrante débil (Lesage et al., 1996a). Subsecuentes miembros de la familia se han clasificados en seis grupos, I: TRAAK, TREK-1, TREK-2; II: TALK-1, TALK-2, TASK-2; III: KCNK7, TWIK-1, TWIK-2; IV: TRESK-1, TRESK-2; V: THIK-1, THIK-2; VI: TASK-1, TASK-3, TASK-5, los cuales se nombran relacionando a TWIK-1, basándose en su secuencia primaria, propiedades electrofisiológicas y regulatorias (Holt et. al., 2006). Estos canales de potasio muestran una compleja regulación por estímulos físicos y químicos, incluyendo tensión membranal, sensibilidad al oxígeno (hipoxia), cambios en la osmolaridad (presión osmótica), temperatura o en el pH extra o intracelular. Algunos de ellos pueden ser modulados intracelularmente por segundos mensajeros y/o neurotransmisores, ácidos grasos libres y anestésicos (Patel y Honore, 2001a; Talley et al., 2003).

1.3 CANAL DE POTASIO TASK-3

De la familia de canales de potasio 4TM/2P tres especies han sido clasificadas como ácido sensibles, pues exhiben alta sensibilidad a la concentración de protones cerca del intervalo fisiológico: TASK-1, TASK-3 y TASK-5 (por TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channel) (Duprat *et. al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2000, Kim y Gnatenco, 2001).

El canal de K^+ TASK-3 de rata es un polipéptido de 1185 pares de bases que codifican para 395 aminoácidos (aa) (**Figura 1.3**). El canal presenta 54% de identidad con

el canal TASK-1 y 51% con TASK-5, pero menos del 30% con otros canales de K⁺ 4TM/2P (Kim *et al.*, 2000).

	М	К	R	Q	Ν	v	R	Т	L	s	\mathbf{L}	I	A	С	Т	F	Т	Y	L	L	
1	at	gaa	.geg	gca	gaa	cgt	geg	tac	cct	gtc	ctt	gat	cge	ctg	tac	ctt	cac	cta	cct	gctg	60
	V	Ğ	A	Ā	v	F	D	A	L	Ē	S	D	H	E	М	R	Ε	Ε	Е	ĸ.	
61	gt	ggg	tgc	cgc	ggt	gtt	cga	cgc	cct	cga	gtc	gga	ccat	tga	gat	geg	cga	gga	gga	gaaa	120
	L	Κ	A	E	E	v	R	L	R	G	К	Y	Ν	I	S	S	D	D	Y	Q	
121	ct	taa	age.	aga	aga	ggti	ccg	cct	cag	agg	rcaa	gta	caa	cat	cag	ctc	cga	tga	cta	ccag	180
	Q	L	Ε	L	V	I	L	Q	s	Ε	Ρ	н	R	A	G	V	Q	W	K	F	
181	ca	gct	gga	get	ggt	aat	cct	gca	gtc	tga	gee	cca	ccg	cge	tgg	tgt	cca	gtg	gaa	gttc	240
	A	G	S	F	Y	F	A	I	Т	v	I	Т	Т	I	G	Y	G	н	A	A	
241	ge	cgg	gtc	ctt	cta	ctt	cgc	tat	cac	tgt	cat	cac	aact	tat	cgg	ata	tgg	aca	tge	tgca	300
	P	Ğ	T	D	A	G	ĸ	A	F	ē	М	F	Y	A	v	L	Ğ	I	P	Ĺ	
301	cc	tgg	aac	cga	tge	tgg	caa	gge	ctt	ctg	tat	gtt	ctai	tge	tgt	get	ggg	tat	ccc	tctg	360
	Т	L	v	М	F	Q	s	L	G	E	R	М	Ν	Т	F	v	R	Y	L	L	
361	ac	gct	ggt	tat	gtt	cca	gag	cct	aaa	cga	geg	cat	gaa	cac	ctt	cgt	geg	cta	cct	gctg	420
	Κ	R	I	К	ĸ	С	-c-	G	M	R	N	Т	Ē	v	s	M	Ē	Ν	М	v	
421	aa	acq	gat	caa	gaa	ata	ctq	taa	cat	aca	rcaa	cac	tga	aqt	ttc	tat	aaa	qaa	cat	aata	480
	Т	v	Ğ	F	F	້ສ້	c	M	G	Ľ	v	Р	Ũ	Ã	A	A	F	ัร -	Q	č	
481	ac	cat	caa	ctt	ctt	ttc	tta	cat	aaa	cct	cat	acc	tta	aac	aac	tac	ctt	ttc	cca	atac	540
	E	D	-99 10	s	F	F	н	A	Y	Y	Y	c	F	I	T	L	т	т	I	G	
541		- ana	tta	nan	et.t.	etti	rca.	cac	tta	cta	cta	eta	- etti	rat.	tac	act	aac.	tar	tat	aaaa	600
	F	Ģ	D	F	v	Å	т.	õ	S	ĸ	G		T.	0	R	ĸ	P	F	Y		
601	t.t.	caa	raa	ett.	tatı	aac	eet.	aca	atc	caa	aaa	tac	eet.	nca.	uau	maa	anc	- att	rta.	cata	660
001	1	-99 F	S	יייי. ד	M	y ago. V	т	JUG I.	v	G	.999 I.	T	v	T	G	jaa 1	900 F	цос Т.	N	I.	000
661	<u></u>	ctt.	cau	rtt	cat.	ata	tat.	cct.	aat.	aaa	eet.	nac.	catu	rat.	caa	tac	ct.t.	eet.	raa'	tett	72.0
001	v	v	T.	R	F	J.	т	 м	N	999 T	D	E	D	T.	-99 I.	E	G	E E	v	A .	
721	ort.	aat.	cet.	aca	- att	eet.	nac.	cat.	naa	tac	raa	- taa	~ amat	tet.	tet	ana -	aaa	- ana	aotr	taca	780
121	0	ggc T	со с т.	100	G	N	P	R	R	v	v	v	R	v	P	0	999 S	R	K	R	.00
781	ra ra	- ten	act	tae	taa		- 	nee	ar a	Tron	aat.	tort.	e e e e e	tort.		¥ tra	~ nen	tra	raa.	aeaa	840
.01	н	дас н	p	M	v99	F	т.	D	v	990 V	990 C	D D	сод. т	I.	goo c	v	Jug I.	c c	ন	9099 D	0.0
841	 			n ret	nt e	~++,		neu 1	mee	at a	eaa	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	- 	eet.	ata	cta	tet	ota	-++-	reet	900
011	G	.cca	M	ы ы	gca c	ссс. п	п	саg п	n D	n n	n. D	ссу п	n D	0 0	ycy W	r F	M	υ v	17	W	500
0.01	~	+ ~~~	-14 -14	ata	~~~	+ ~~~	+ ~~	+ ~~	+ ~ ~	~~~	+ ~ ~	+ ~~~	tae	~~~	a art		-14 -14	+ ~+	v not	eort t	060
901	99 T	uge T	D D	.ccg	999 D	суа р	cya م	uya v	uya. م	cya ۱	uya. م	cya م	دyaı م	uge: م	cyc ۸	cya T	yaa D	cyc c	D D	ayıı e	900
0.61	1	1	F +	• • • • •	F +	F	A.				Настания Настания	A.	A	A.	A	1 +	F +		F		1020
961	ac	tac	tee	tgt	tee	tcc	tge	tgt	tge	tge	tge	tge	tgei	tge	tge	tac	tee	tgg	LCC	cagt	1020
1001	1	. к	14	. v	. к	A	1		н	ວ 	v	ວ 				면 	면		Р	P	1000
1021	ac	cag	gaa	tgt	ccg	ggc.	tac	agt	cca	CtC	ggt	ttC	ctg	cag	ggt	tga	aga	gat	ccc	tccg	1080
	D	V	Г	R	Ν	Т	Y	F.	R	S	Р	F.	G	A	I	Р	Р	G	м	н	
1081	ga	.cgt	get	gag	gaa	cac	cta	ctt	ccg	gtc	ccc	att	cgg	cgc	cat	ccc	tcc	tgg	aat	gcac	1140
	Т	С	G	E	Ν	н	R	L	н	Ι	R	R	к	S	Ι	*			_		
1141	ac	ctg	cgg	gga	aaa	cca	cag	gct	gca	cat	ccg	tcg	caa	gtc	cat	cta	a	118	8		

Figura 1.3. Secuencia de nucleótidos y amino ácidos del canal TASK-3 (KCNK9) de rata. Cuatro segmentos transmembranales (subrayados) y dos dominios formadores del poro (letras azules).³

Este canal se expresa en varios organos: riñón, hígado, pulmón, colon, estómago, bazo, testículo, músculo esquelético y en el sistema nervioso central (Kim *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2000; Kim y Gnatenco, 2001, Talley *et al.*, 2001). TASK-3 es un canal basal selectivo a iones K^+ , rectificador saliente, y es activo en el intervalo fisiológico de

³ Figura tomada y modificada de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed, NCBI: NM_053405.

potenciales de membrana, contribuyendo a fijar el potencial de reposo en la membrana de las células que lo expresan de manera nativa o heterólogamente (Rajan *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2000).

Debido a la gran identidad que existe entre TASK-1 y TASK-3, estos canales tienen características y comportamientos similares. Por observaciones hechas en células del gránulo cerebral y células neurosecretoras magnocelulares del núcleo supraóptico, se cree que al coexpresar ambos canales en la misma célula estos forman heterómeros como consecuencia de poseer el mismo nivel de expresión (Czirják y Enyedi, 2002a; Han *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). Por lo tanto, la excitabilidad celular a neurotransmisores podría depender de la modulación de los niveles de expresión de cada canal (Watkins y Mathie, 1996; Han *et al.*, 2002, Berg *et al.*, 2004).

Una propiedad funcional interesante de TASK-3 es su sensibilidad a los cambios en el pH externo (pH_e) (Duprat *et. al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2000; Meadows y Randall, 2001). Esto sugiere que puede regular la excitabilidad de neuronas durante el incremento de la actividad cuando el espacio extracelular llega a ser más ácido. Se ha reportado (Palmer *et al.*, 2003) que durante la exocitosis existe una acidificación de al menos 0.6 unidades en el valor del pH, lo que sugiere que los canales TASK podrían estar presentes en el nervio terminal, detectando estos cambios en el pH_e y alterando la eficiencia pre-sináptica, así como respuestas post-sinápticas.

Los canales TASK-3 son blancos de neurotransmisores que se unen a receptores de proteínas G del subtipo $\alpha q/11$ (Gq/11). En ciertas neuronas TASK-3 se inhibe por neurotransmisores y hormonas peptídicas como serotonina, norepinefrina, hormona liberadora de tirotropina y angiotensina II por activación de receptores acoplados a Gq/11 (Karschin *et al.*, 2001; Czirják,y Enyedi, 2002c; Talley y Bayliss, 2002, Chen *et al.*, 2006). Los canales TASK-3 también se bloquean por Ba²⁺ (57%, 3mM), Zn²⁺ (70%, 100µM), rojo de rutenio (oxicloro de rutenio amoniacal) (70%, 10µM); bupicaína (50%, 100µM), lidocaína (62%, 1mM); quinina (40%, 100µM), quinidina (37%, 100µM), y por alfaxolono (49%, 100µM) (Kim *et al.*, 2000; Meadows y Randall, 2001; Patel y Honoré, 2001b). Es importante mencionar que el rojo de rutenio no causa ningún efecto sobre las corrientes de TASK-1 o del heterómero TASK-1/3, haciendo de este bloqueador una herramienta útil para diferenciar al TASK-3 de TASK-1. Sin embargo,

todos ellos son bloqueadores inespecíficos de TASK-3, ya que inhiben a otros canales, siendo inadecuados para el estudio de este canal en sistemas vivos (Czirják,y Enyedi, 2002b y c; Kim, 2005).

El único activador de TASK-3 es el anestésico halotano (65%, 1mM) (Patel *et al.*, 1999). Por otra parte, los canales TASK-3 interaccionan con la proteína 14-3-3, expresada abundantemente y relacionada con varios procesos celulares como la división celular, apoptosis, traducción de señales, síntesis y liberación de neurotransmisores, función de canales iónicos, expresión de genes, entre otros (Rajan *et al.*, 2002). La proteína 14-3-3 reconoce a la secuencia RRKSV situada del lado carboxilo terminal de TASK-3, promoviendo su tráfico a la membrana plasmática y regulando su grado de expresión durante el crecimiento celular. Así mismo, regula la excitabilidad de la célula y cambia el restablecimiento en la conductancia del K⁺ cuando es necesario (O´Kelly *et al.*, 2002).

La apoptosis, o muerte celular programada, está asociada con un flujo excesivo de iones al exterior y una reducción en la concentración intracelular de K⁺ en algunos tipos de células (Borther et al., 1997; Yu, 2003). En neuronas del gránulo cerebral, que sufren de apoptosis durante la fase del desarrollo temprano, se encontró que los canales de TASK-3 son críticos para la muerte celular. Bloqueando su actividad por disminución en el pH_e o por medio de la transfección con una mutante no funcional, se observa una disminución de la apoptosis en ese tipo de células (Lauritzen et al., 2003). Además la sobreexpresión de TASK-3 en neuronas del hipocampo induce a la muerte celular, proporcionando evidencias de que el flujo de iones de K⁺ al exterior se lleva a cabo por medio de canales TASK (Patel y Lazdunski, 2004). Interesantemente, TASK-3 es sobreexpresado en cáncer de mama, pulmón, colon y próstata (Mu et al., 2003; Pei et al., 2003; Patel y Lazdunski, 2004, Kim, et al., 2004). Se encontró que la sobreexpresión de TASK-3 en líneas celulares promueve la formación de tumores y confiere resistencia a hipoxia y privación de suero (Mu et. al., 2003). La mutante no funcional elimina la actividad del canal TASK-3 cuando son expresados juntos, inhibiendo además su propiedad oncogénica. Incrementando el restablecimiento en la conductancia de K⁺ en puntos críticos durante el crecimiento celular, el canal TASK-3 puede ser oncogénico o podría potenciar las actividades de otras sustancias oncogénicas. Inhibidores de TASK-3 pueden prevenir la asociación de TASK-3 como potencial oncogen en estos tejidos (Kim, 2005).

1. 4 TOXINAS DE ALACRÁN

Diversas especies de animales venenosos, como anémonas de mar, gusanos, alacranes, serpientes, caracoles marinos (conus), entre otros, están distribuidos en todo el mundo y su veneno es empleado como un mecanismo de defensa y/o estrategia para capturar su presa. Los alacranes son animales esencialmente nocturnos que viven en regiones tropicales y subtropicales y su distribución geográfica mundial es extensa. Existen cerca de 1500 especies diferentes y solamente en México hay siete familias de alacranes con 23 géneros y 221 especies y subespecies, siendo el más peligroso el género *Centruroides* (Dehesa-Davila y Possani, 1994) y del que se conocen seis especies consideradas peligrosas para el hombre. El veneno de alacrán es un líquido blanquecino lechoso formado por diferentes tipos de moléculas: proteínas (enzimas), aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lípidos, serotonina, sales y además contiene una variedad de péptidos tóxicos para el hombre (neuropéptidos) (Possani, 1984; Zlotkin *et al.*, 1978).

Estudios previos acerca del mecanismo de acción de las toxinas presentes en el veneno de alacrán, han mostrado que actúan sobre canales iónicos produciendo modificaciones en el potencial de acción o induciendo cambios en la permeabilidad de los canales iónicos, modificando el flujo de iones a través estos (Possani, *et al.*, 1999a). Las toxinas de alacrán han evolucionado a lo largo del tiempo presentando diferentes motivos estructurales, con el fin de adaptarse a diferentes estrategias de modulación de los canales iónicos (bloqueo o activación); sin embargo, presentan convergencias moleculares y funcionales. Como consecuencia se ha evidenciado que los blancos de esta toxinas pueden tener orígenes evolutivos comunes (Mouhat *et al.*, 2004a; Jouirou *et al.*, 2004a), por los que su estructura primaria es muy parecida y su estructura tridimensional presenta motivos conservados (Zerrouk *et al.*, 1993); pero el mecanismo de acción molecular en términos de afinidad y especificidad varía considerablemente (Vazquez *et al.*, 1990).

Las toxinas de los alacranes que actúan sobre los canales iónicos de K^+ , se caracterizan porque son péptidos globulares de bajo peso molecular (3-8kDa) generalmente de una sola cadena de 23–70 aa, básica y muy estable (**Figura 1.4**), presentes generalmente en cantidades mínimas. Se han clasificado de acuerdo a su estructura dentro de ocho categorías, estas estructuras contienen entre dos y cuatro estructuras secundarias bien

definidas, en un intervalo de combinaciones de hojas- β , hélices- α o una mezcla de ambas estructuras, existiendo algunas varientes en la misma combinación (Mouhat *et al.*, 2004a; Jouirou *et al.*, 2004a). Se encuentran unidas por puentes disulfuros (2–4) en relación a la longitud de su cadena, siendo estructuralmente una molécula compacta donde todos los residuos están expuestos al disolvente, excepto los de cisteínas que se encuentra dentro del péptido (García *et al.*,1998; Rodríguez y Possani, 2004). Esta estructura le confiere cierta rigidez, estabilidad en su estructura secundaria, así como resistencia relativa a la desnaturalización (calor, ácido/base, detergentes, etc.). Las toxinas son suficientemente estables para resistir la degradación por proteasas presentes en el veneno.



Figura 1.4. Estructura terciaria de una toxina de alacrán para un canal de K⁺ (caribdotoxina)⁴. Se muestra la hélice- α , las hojas- β , los puentes disulfuros y la estructura de la cadena. Las extremidades terminales se encuentran indicadas como N y C.

Poco más de 25 años han transcurrido desde que la primera toxina del veneno de alacrán (Noxiustoxin) fue aislada de *Centruroides noxiux* (Possani *et al.*, 1982) y mostró un efecto en la permeabilidad al potasio en el axón del calamar gigante (Carbone *et al.*, 1982); aunque la más ampliamente estudiada es la Charybdotoxina (ChTx) descrita en 1985 (Miller *et al.*, 1985). Inicialmente se pensó que la ChTx era la única en su género, provocando un significante incremento de investigación en esa área, ya que el péptido mostró ser un excelente modelo para el estudio de la función y correlación con la estructura de los canales de K⁺. El número de toxinas ha aumentado de tal manera que se hizo necesaria su clasificación (Miller, 1995). Se les han llamado KTx toxinas y se han agrupado en 3 familias (α -, β - y γ -toxinas de alacrán) (Tytgat *et al.*, 1999) de acuerdo a su

⁴ Figura tomada de Mouhat *et al.*, 2004a.

alineamiento de secuencia primaria. Todos estos péptidos inhiben la actividad de los canales por unión a residuos en el vestíbulo externo del canal y físicamente bloquean el poro, exhibiendo una significante homología en su secuencia primaria de aminoácidos. Algunos de ellos se unen en una región del canal que sólo está disponible cuando esta se abre (Jouirou *et al.*, 2004a; Lewis y García, 2003).

Estos péptidos inhibidores de canales de K⁺ han sido de gran utilidad para determinar la arquitectura molecular de estos canales, purificar los canales de su tejido nativo, determinar la composición de sus subunidades y determinar su papel fisiológico dentro de los tejidos sobre los cuales actúan (García et al., 1998). Además son valiosas herramientas para evaluar tanto diferencias estructurales (Krezel, et al., 1995; Stampe et al., 1994; Thompson y Begenisich, 2000; Myerss y Stampe, 2000) como mecanismos de acción entre los distintos tipos de canales (Rauer et al., 2000; Giangiacomo et al., 2000). Mediante el uso de toxinas de alacrán se ha logrado establecer de manera aproximada la topología y las dimensiones del poro de los canales de potasio. Estas toxinas son usadas extensamente como invaluables herramientas bioquímicas y farmacológicas, que al ser selectivas y tener alta afinidad contribuyen al entendimiento de funciones fisiológicas y pato-fisiológicas, así como a la identificación de canales de potasio como blancos terapéuticos para enfermedades. Representan una alternativa interesante para el desarrollo de nuevas drogas, algunas de ellas relacionadas con los tratamientos anticancerígenos. Son fáciles de caracterizar, de producir en forma sintética, proveen varias vías de interesantes investigaciones en términos de ingeniería molecular; además pueden ser muy distintas por la gran variedad estructural y funcional que presentan los canales iónicos de potasio (Jouirou et al., 2004a; Mouhat et al., 2004a).

1.5 OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

En 1971, se demostró que los ovocitos de *Xenopus laevis*, (la rana con garras) del sur de África, eran capaces de sintetizar hemoglobina después de la inyección del ARN_m de la proteína correspondiente (Gurdon *et al.*, 1971), desde entonces, los sistemas de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* han permitido el estudio molecular y la caracterización

funcional de muchos canales iónicos y receptores de neurotransmisores existentes. Además de su habilidad para traducir eficientemente ARN_m exógenos en proteínas, los ovocitos *X*. *laevis* proporcionan ciertas ventajas: son fáciles de manejar ya que su diámetro es de 1.1-1.3mm, son muy resistentes y cuentan con la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas; expresan un pequeño número de sistemas de transporte endógeno, lo que hace que el ruido de fondo de las proteínas con respecto a la proteína expresada de forma heteróloga sea pequeño.

De acuerdo a su tamaño, los ovocitos tienen seis diferentes estados de desarrollo (I-VI), los de las etapas V y VI varían muy poco en apariencia y tamaño, sólo difieren en su estado metabólico, por lo que son utilizados para ensayos electrofisiológicos. Estos deben ser tratados previamente con colagenasa para remover la membrana folicular y mantenerlos en medios con gentamicina a 15°C para prevenir contaminación (**Figura 1.5**).



Figura 1.5 Rana y ovocitos de la especie *Xenopus laevis*. (A) Se presenta un ejemplar de la rana africana *Xenopus laevis*. (B) Se muestran ovocitos de los estadios V-VI, que son los que se utilizan para los ensayos electrofisiológicos⁵.

El ARN_m se sintetiza a partir de un plásmido que contiene el promotor fuerte de un bacteriófago, como SP6 ó T7 y un ADN_c que codifica para una proteína. Para una eficiente traducción de proteínas se debe inyectar de 1-5ng de ARN_m, cantidad suficiente para obtener una elevada expresión. Bajo condiciones adecuadas, los ovocitos pueden ser almacenados hasta por 10 días después de la inyección (Wagner *et al.*, 2000).

⁵ Figura tomada de www.mpibp-frankfurt.mpg.de/schwarz/xenopus.gif.

1. 6 FIJACIÓN DE VOLTAJE POR DOS ELECTRODOS (TEVC)

La técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC) por sus siglas en inglés (Two Electrode Voltage Clamp), es la herramienta electrofisiológica más ampliamente usada para medir, en toda la célula, las corrientes de los canales iónicos expresados en ovocitos de *X. laevis* permitiendo el control del potencial de membrana (Stühmer and Parekn, 1995).

La membrana de los ovocitos es penetrada por dos microelectrodos, uno que detecta el voltaje y el otro que inyecta la corriente. El potencial de membrana es medido por el electrodo que detecta el voltaje que se encuentra conectado a un amplificador donde la señal es comparada con un voltaje control dado por un generador. La diferencia de potencial altamente amplificada de estas señales es aplicada como una corriente a través del electrodo que inyecta corriente, a través de la membrana y a un electrodo de referencia que se encuentra en el baño conectado a tierra (**Figura 1.6**). Así, la corriente inyectada es monitoreada para proveer una medida de la corriente total de la membrana. Todos los iones electrogénicos o sustancias que fluyen a través de la membrana son medidos como una desviación de la corriente base (Baumgartner *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2000).

Los microelectrodos se preparan empleando capilares de vidrio, pulidos con calor para evitar dañar la capa de AgCl del electrodo de Ag/AgCl, cuando se inserta dentro del capilar, y posteriormente se estiran. Ambos electrodos se llenan con una solución de KCl (3M) y se conectan al amplificador. La resistencia de los electrodos varía entre 0.3 y 2M Ω , para tener una punta de tamaño adecuado (Stühmer, 1992, 1998; Müller, 1992). Los microelectrodos se insertan dentro del ovocito con la ayuda de un microscopio estereoscópico y micromanipuladores. La penetración y manipulación se monitorea en el modo de fijación de corriente (donde ambos electrodos registran el potencial de membrana) por la rápida desviación del potencial eléctrico, el cual esta usualmente entre -35 a -45mV dependiendo de la proteína expresada. Sólo después de la penetración de los dos electrodos el amplificador se cambia al modo de fijación de voltaje (Stühmer, 1998).



Figura 1.6 Diagrama de la técnica fijación de voltaje por dos electrodos (TEVC). I' es el electrodo que inyecta la corriente necesaria para fijar el potencial del ovocito al potencial de membrana deseado el cual es medido por el electrodo de voltaje E'. A es el amplificador que mide la corriente, el potencial e inyecta la corriente⁶.

El sistema se monta sobre una tabla neumática anti-vibracional que reduce las oscilaciones que dañan la membrana alrededor del sitio de implementación de los electrodos (Wagner *et al.*, 2000). Se emplea una caja de Faraday para eliminar cualquier efecto de los campos electromagnéticos en el ambiente.

Las corrientes se miden con un amplificador (Axon, Dagan, Heka) y se registran con un convertidor analógico digital (ADInstruments, Digidata, ITC16, Labmaster) conectado a una computadora para almacenar los datos y se analizan posteriormente usando el software adecuado. Las corrientes de los canales iónicos se producen activando a los canales con pulsos a diferentes valores de potencial a un tiempo determinado, a partir de un potencial de mantenimiento.

⁶ Figura modificada de Wagner *et al.*, 2000.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

En 1995, se identificó la existencia de una nueva familia de canales de potasio con dos dominios de poro (2P) en la levadura Saccharomyces cereviasae (Ketchum et al., 1995). Al siguiente año, Wei y colaboradores (Wei et al., 1996), durante el estudio del genoma de Caenorhabditis elegans, confirmaron la presencia de ocho familias de canales de potasio; una de ellas formada por canales 2P en la misma cadena polipeptídica, confirmando los hallazgos previamente descritos. Ese mismo año, Lesage y colaboradores (Lesage et al., 1996a) clonaron un canal de potasio humano de cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4TM/2P) al que se le llamó TWIK-1 (Tandem 2P domain, Weak Inward rectifier K^+ Channel), ampliamente distribuido en diferentes tejidos y abundante en corazón y cerebro. Se demostró que estos canales son dímeros (Lesage et al., 1996b), en contraste con los otros canales de potasio cuya cadena polipeptídica contiene un solo poro, los cuales forman tetrámeros. Duprat y colaboradores (Duprat et al., 1997) clonaron un canal similar a TWIK-1 pero dependiente del pH extracelular al que se le llamó TASK (*T*WIK related Acid Sensitive K^+ Channel). Posteriormente de cerebelo de rata se clonó un canal con 54% de identidad con TASK-1 al que se le llamó TASK-3 (Kim et al., 2000). TASK-3 es un canal basal selectivo a iones K^+ , rectificador saliente, el cual contribuye a fijar el potencial de reposo en la membrana de todas las células que lo expresan (Rajan et al., 2000; Chapman et al., 2000). Interesantemente, se ha encontrado sobreexpresado de manera importante en células cancerígenas de mama, pulmón, colon y próstata (Mu et al., 2003), sugiriendo que TASK-3 juega un papel importante en patogénesis de algunos carcinomas humanos, como un poderoso oncógeno. Suprimiendo la actividad de este canal mediante la mutación puntual G95E (región del poro) se anulaban sus funciones oncogénicas (Pei et al., 2003), como el crecimiento tumoral y la función promotora del tumor. También es importante mencionar que este canal podría estar relacionado con la muerte celular programada (apoptosis), por observaciones hechas en neuronas del gránulo cerebral que inhibiendo las corrientes de TASK-3 por acidificación extracelular o adición de rojo de rutenio se prevenía la apoptosis (Lauritzen et al., 2003; Patel y Lazdunski, 2004). Sin embargo, no existen compuestos que selectivamente inhiban

Antecedentes

a TASK-3 sin bloquear a otros canales iónicos y a sus propiedades oncogénicas. El desarrollo de drogas que selectivamente afecten a este canal, serían de gran valor para entender su función y podrían ser potencialmente útiles como agentes terapéuticos para detener la progresión del cáncer y la muerte celular en ciertos tejidos.

Por otra parte, se conocen alrededor de un centenar de bloqueadores de canales de potasio de un poro (1P), provenientes de veneno de alacrán; sin embargo, no existe ligando que bloquee alguno de los canales de potasio 2P y, por lo tanto, de TASK-3. Se cree que cada especie de alacrán podría contener una batería propia de toxinas para bloquear diferentes tipos de canales, aunque esto no quiere decir que pueda bloquear a cada uno de los canales existentes. Si esto es así, entonces los canales recientemente clonados formados por dos poros continuos, objeto de este trabajo, también podrían ser el blanco de uno o varios componentes de tales baterías de neurotoxinas Esta situación nos ofrece un campo virgen para: (i) encontrar nuevas familias de péptidos que modulen a este tipo de canales; (ii) cooperar en la elucidación de la estructura del nuevo poro "asimétrico" y finalmente (iii) realizar un estudio sistemático que permita caracterizar posibles ligandos naturales provenientes del veneno de alacrán para moléculas consideradas oncogénicas.

2.1. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia que tiene el canal de potasio TASK-3 para la fisiología celular, el estudio de diferentes venenos en la búsqueda de fármacos y potentes inhibidores específicos para este tipo de canales es una tarea de gran relevancia. En este trabajo se estudió el efecto del veneno de dos alacranes que habitan en la República Mexicana (*Centruroides limpidus, Hadrurus gertschi*) y uno en Brasil (*Opisthacanthus cayaporum*) con el objeto de encontrar péptidos que modifiquen la actividad del canal de potasio TASK-3.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el veneno de diferentes especies de alacranes para encontrar péptidos con actividad hacia el canal TASK-3.

2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Clonar el canal TASK-3 de rata.
- Implementar el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*, del canal TASK-3 de rata.
- Montar el sistema de registro usando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.
- Probar en el canal TASK-3 de rata, el efecto de fracciones totales y parciales de dos especies de alacranes que habitan en la República Mexicana y uno en Brasil.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CLONACIÓN DE TASK-3 DE RATA

3.1.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (ARN_T)

Los reactivos, material y agua usada en la obtención y manejo de ARN se trataron de acuerdo a los protocolos básicos para trabajar en condiciones libres de ARNasas reportados en Sambrook *et al.*, (1989). La composición de todas las disoluciones utilizadas en este proyecto se presentan en el **apéndice**.

Para la obtención del ARN total (ARN_T) de cerebro de rata se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596-026), que contiene fenol e isotiocianato de guanidinio, este último es un agente desnaturalizante muy eficaz que permite la separación del ARN a partir de tejidos con alto contenido de ribonucleasas endógenas. El ARN se puede extraer de una disolución acuosa de isotiocianato de guanidinio 4M a pH = 4, (en presencia de una mezcla orgánica de fenol/cloroformo). Bajo estas condiciones ácidas, la mayoría de las proteínas y de los fragmentos pequeños de ADN (50-10kb) permanecen en la fase orgánica, mientras que el ADN de peso molecular elevado y algunos residuos de proteínas se encontrarán en la interfase. Posteriormente, el ARN se purifica mediante precipitación con isopropanol, se lava el precipitado con alcohol y finalmente se redisuelve el ARN en agua.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Winstar, de 240 a 250g y de aproximadamente 3 meses, adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Química, UNAM. Las ratas fueron anestesiadas con 0.2mL de barbital (1mg/mL) (Sigma Aldrich) y posteriormente decapitadas con una guillotina. Se extrajo el cerebro y se lavó con medio salino de fosfato Dubelco y rápidamente se homogeneizó (Biospec Products, Inc., Mod 985-370) durante 1min a temperatura ambiente (22-24°C) en presencia de Trizol, 1mL por cada 100mg de tejido.

El homogeneizado se incubó a temperatura ambiente por 5min, se adicionó cloroformo (J.T. Baker, R.A.), 0.2mL por cada mL de Trizol; con un vortex (Fisher Scientific, Genie 2) se agitó vigorosamente por 15s, se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 3min y se centrifugó (Beckman, Avanti 30 compact centrifuge) a 12 880Xg

durante 15min a 4°C. El ARN obtenido en la fase acuosa, se transfirió a un tubo eppendoff nuevo (1.5mL) y se precipitó con isopropanol (J.T. Baker, R.A.), 0.5mL por cada mL de Trizol; se agitó suavemente, se incubó a temperatura ambiente por 10min y se centrifugó nuevamente a 12 880Xg durante 15min a 4°C.

El precipitado se lavó dos veces con etanol (J.T. Baker, R.A) al 75% (v/v), (agua destilada tratada con DEPC (Fluka, R.A) al 0.01% (v/v)), 1mL por cada mL de Trizol, decantando la disolución de alcohol y centrifugando a 12 880Xg durante 10min a 4°C. Finalmente se resuspendió el ARN en agua libre de ARNasas (Invitrogen) a 55°C.

La cantidad de ARN se determinó a 260nm, longitud de onda donde presenta una absorbancia máxima debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas (Chirgwin *et al.*, 1979; Han *et al.*, 1987; MacDonald *et al.*, 1987), en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter DU 530) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa) al 2%, teñido con bromuro de etidio (10mg/mL) (GIBCO BRL), para comprobar la presencia de las bandas correspondientes al ARN ribosomal (ARN_r). El equipo empleado para todos los análisis electroforéticos fue una cámara de electroforesis (Owl Scienfific Inc., B1A), un transiluminador de UV (UVP, Inc.) y una cámara fotográfica, acoplados al programa computacional KDSID 2.0 (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Análisis System 120).

El ARN_T obtenido fue almacenado a -80°C hasta su uso posterior.

3.1.2 OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

El método empleado para la obtención de ADN_c utiliza la enzima transcriptasa reversa (RT). La transcriptasa reversa sintetiza ADN_c a partir de ARN mensajero (ARN_m) y como otras polimerasas requiere un templado y un iniciador (oligonucleótido). Al final de esta reacción se obtienen híbridos ARN_m/ADN_c . Posteriormente por tratamiento enzimático con la ribonucleasa H (ARNasa H) se degrada selectivamente el ARN_m de los híbridos hasta oligonucleótidos, quedando solamente las cadenas sencillas de ADN_c (**Figura 3.1**).



Figura 3.1.Pasos para la síntesis de ADN_c¹.

En este estudio se utilizó el kit Omniscript Reverse Transcriptase de (QIAGEN, Cat. No. 205110); el cual emplea una enzima con tres actividades enzimáticas distintas: un ARN polimerasa dependiente de ADN, que transcribe ADN_c apartir de un templado de ARN; un híbrido dependiente de exoribonucleasa (ARNasa H), que específicamente degrada el ARN en híbridos de ARN:ADN y una ADN polimerasa dependiente de ADN. En esta reacción *in vitro* de transcipción reversa las primeras dos actividades son utilizadas para producir el ADN_c.

Se empleó el ARN_T como templado para la transcripción reversa y como iniciador un oligonucleótido diseñado específicamente para la región carboxilo terminal o extremo 3' (antisentido): cccaagcttttagatggacttgcgacgga, tomando los últimos diecisiete aa de la secuencia nucleotídica original de ADNc de rata (NCBI: NM_053405)², diseñado con el programa Biology Workbench.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del siguiente protocolo:

- Se descongelaron y colocaron en hielo los reactivos. Se agitaron y centrifugaron brevemente para colectar el líquido de las paredes en los tubos.
- Se preparó una mezcla de acuerdo con la tabla 3.1.
- Se agitó, centrifugó e incubó (Precision Scientific Inc., Cat No. 31744) por 60min a 37°C.
- Una vez terminada la reacción, se almacenó a –20°C.

¹ Figura modificada: manual del kit Omniscript Reverse Transcriptase de QIAGEN.

² http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed

Componentes	Volumen/reacción	Concentración final					
	(µL)						
Buffer (10X)	2	1X					
Mezcla dNTP	2	0.5mM c/dNTP					
(5mM c/dNTP)							
Oligonucleótido (10mM)	2	1µM					
Enzima (RT)	1	4 unidades					
Agua libre de ARNasas	9	-					
Templado de ARN _T	4	0.1µg/mL					
(0.5µg/mL)		. 2					
Volumen total	20	-					

Tabla 3.1. Componentes de la reacción de Transcripción Reversa.

3.1.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN_C CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida como PCR por sus siglas en ingles, es una técnica (Mullis y Faloona., 1987) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, usa ciclos modificando la temperatura para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

La hebra inicial del ADN_c que codifica para TASK-3 en cerebro de rata se obtuvo siguiendo el método de PCR, empleando el Kit HotStarTaq Master Mix (QIAGEN, Cat. No. 203443). El método utiliza como templado el producto de la transcripción reversa. Como iniciadores para este PCR se sintetizaron los oligonucleótidos específicos de los extremos 3' (antisentido) o región carboxilo terminal: cccaagcttttagatggacttgcgacgga, empleado en la reacción anterior y 5' (sentido) o región amino terminal: cccaagcttgccaccatgaagcggcagaacgtg, tomando los primeros dieciocho aa de la secuencia nucleotídica de TASK-3 de rata, adicionándoles el sitio de corte de la enzima *Hind III* para un posterior análisis de identificación de clonas. La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del siguiente protocolo:

• Las soluciones se descongelaron, se colocarón en hielo, se agitarón y se centrifugarón.

Componentes	Volumen / reacción	Concentración final
	(μL)	
Mezcla maestra de HotStartTaq	2.5	2.5 unidades (enzima) 1X buffer de PCR 200µM/dNTP
		1.5mM de MgCl ₂
Oligonucléotido A (10mM)	0.5	0.25mM
Oligonuclótido B (10mM)	0.5	0.25mM
H ₂ 0	19	-
Templado de ADN	5	1µg/reacción
Volumen Total	20	-

• Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 3.2):

Tabla 3.2. Componentes de la reacción de PCR.

- Se mezcló y centrifugó brevemente.
- La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp. PCR System 9700 PE), programando el siguiente ciclo térmico (Tabla 3.3):

Paso inicial de activación:	15min	95°C
3 pasos cíclicos:	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización	0.5	94
Alineamiento	0.5	55
Extensión	1	72
Número de ciclos	30 ciclos	-
Extensión Final	10	72

Tabla 3.3. Programa térmico de la reacción de PCR.

Junto con la reacción de PCR se utilizó un control negativo sin adicionar a la mezcla de reacción el templado de ADN. Los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, para observar la presencia de las bandas correspondientes al ADN amplificado.
3.1.4 LIGACIÓN.

El fragmento amplificado de ADN_c de TASK-3 de rata, se ligó al vector TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Cat. No. K4660-01), el cual es altamente eficiente en la inserción directa de los productos de PCR dentro del plásmido, obteniendo de esta manera un ADN recombinante.

En el último paso de la reacción de PCR (extensión final), la polimerasa tiene una actividad terminal de transferasa que agrega una cola de deoxiadenosina (dATP) a los extremos 3' de los productos de PCR. El vector linearizado tiene residuos en el extremo 3' sobresalientes de deoxitimidina (dTTP). Esto permite que los extremos de los productos amplificados de PCR se liguen eficientemente con el vector. Este vector cuenta con los promotores SP6 y T7, además de conferir resistencia a ampicilina, secuencias empleadas en pasos posteriores (**Figura 3.2**).



Figura 3.2. Vector TOPO TA³.

La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del siguiente protocolo:

• Una vez descongelados los reactivos, se preparó la siguiente mezcla de acuerdo con la **tabla 3.4**:

³ Figura modificada: http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf

Reactivos	Volumen / reacción						
	(µL)						
Producto fresco de PCR	3						
Solución salina	1						
(NaCl, 200mM; MgCl ₂ , 10mM)							
H ₂ O estéril	1						
Vector TOPO TA	1						
Volumen Total	6						

Tabla 3.4. Componentes de la reacción de ligación con TOPO TA.

- Se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta (GILSON) y se incubó por 5min a temperatura ambiente.
- Una vez terminada la reacción se almacenó a –20°C.

3.1.5 TRANSFORMACIÓN Y TAMIZAJE DE COLONIAS

La transformación es el proceso por el cual las células introducen moléculas de ADN de sus alrededores. Existen diferentes métodos para la introducción de plásmidos en bacterias. El método utilizado en este trabajo fue la introducción del ADN recombinante en células químicamente competentes One Shot TOP10 de *E. Coli*. (Invitrogen, Cat. No. C4040-20), por choque térmico.

Para la transformación de las células competentes se siguieron los siguientes pasos:

- La mezcla de la reacción de ligación se descongeló, centrifugó ligeramente y se colocó en hielo.
- Por otra parte, se descongeló en hielo, un vial de 50µL de las células One Shot.
- Posteriormente, se le adicionó 3µL de la reacción de ligación y se mezcló cuidadosamente. Se incubó en hielo por 30min.
- Se incubó por exactamente 30s a 42°C (Thermolyne Type 17600) y rápidamente se colocó en hielo.
- En un ambiente estéril, se adicionó 250µL del medio rico SOC (Invitrogen).
- Se incubó el vial a 37°C en agitación constante por 1h (Heidolph Instruments, UNIMAX 1010).

- Se adicionó la mezcla de transformación sobre cajas de cultivo con medio LB sólido y ampicilina (Sigma, R.A.) a una concentración de 100µg/mL, bajo un ambiente estéril.
- Las cajas fueron invertidas e incubadas a 37°C toda la noche.

Las colonias que logran crecer en el medio de cultivo, resistentes a la ampicilina, son posibles candidatas a tener el inserto deseado, el ADN_c de TASK-3 de rata. Por lo que las colonias se seleccionan de acuerdo a su ubicación, tamaño y forma, proceso conocido como tamizaje de colonias y se resembraron en 5mL de medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 100µg/mL. Se incubaron a 37°C en agitación constante durante toda la noche, para la purificación posterior del plásmido.

3.1.6 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO (miniprep)

Para el aislamiento de pequeñas cantidades de ADN plasmídico a partir de bacterias (miniprep), se utilizó el kit Plasmid Mini (QIAGEN, Cat. No. 12123), el cual se basa en una modificación al procedimiento de lisis alcalina. El método utiliza dodecil sulfato de sodio (SDS) en presencia de NaOH para desnaturalizar las proteínas bacterianas y el ADN cromosómico y del plásmido. La mezcla se neutraliza con acetato de potasio con lo cual precipitan las proteínas y el ADN cromosómico, mientras que el ADN del plásmido se realinea y es adsorbido selectivamente en una resina de intercambio iónico bajo condiciones adecuadas de pH y baja concentración salina. El ARN, proteínas e impurezas de bajo peso molecular son eliminados por lavado pasando a través de la columna un medio salino que contiene isopropanol. Finalmente el ADN plasmídico se eluye con un amortiguador Tris, EDTA; se concentra y desala por precipitación con isopropanol.

La purificación del plásmido se llevó a cabo siguiendo los pasos del protocolo:

- El cultivo de bacterias del paso anterior se centrifugó a 12 880Xg por 1min y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el precipitado de bacterias en 0.3mL del amortiguador Tris-EDTA (P1).

- Se adicionó 0.3mL del amortiguador NaOH-SDS (**P2**), se mezcló suavemente y se incubó por 5min a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se adicionó 0.3mL de acetato de potasio al 3M (P3) frío, inmediatamente se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 5min.
- Nuevamente, se centrifugó a 12 880Xg por 10min. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente.
- Se equilibró la columna con 1mL de MOPS-Triton X-100 (**QBT**) hasta eluir toda la solución.
- Se adicionó el sobrenadante del paso 5 hasta que fluyó totalmente por la resina.
- Se lavó cuatro veces con 1mL de MOPS (QC).
- Se eluyó el ADN con 0.8mL del amortiguador Tris-base (QF).
- Se precipitó el ADN con 0.56mL de isopropanol a temperatura ambiente. Inmediatamente se centrifugó a 8 950Xg por 30min y cuidadosamente se decantó el sobrenadante.
- Se lavó con 1mL de etanol 70%(v/v), se secó por 5min al medio ambiente y se redisolvió en 40mL de agua desionizada.
- Las clonas fueron identificadas empleando la técnica de PCR bajo las mismas condiciones y los oligonucleótidos específicios antes mencionados. Por medio de una digestión con la enzima *Hind III* (New England Biolabs) se confirmó la presencia del fragmento deseado (Tabla 3.5).

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Plásmido	1	0.01µg/mL
Amortiguador (10X)	2	1X
H ₂ O (Mili-Q)	16	-
Enzima	1	10 unidades
Volumen Total	20	-

Tabla 3.5. Componentes de la reacción de digestión con Hind III.

Ambos procedimientos se llevaron a cabo con el fin de corroborar que las colonias contienen el fragmento del tamaño esperado y fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

3.1.7 SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO CLONADO

Para la secuenciación del fragmento clonado de ADN, se siguió el método automático de secuenciación que se basa en la síntesis enzimática de ADN, terminando la cadena específicamente con 2',3'dideoxinucleótidos (ddNTPs) como análogos de los nucleótidos trifosfato (dNTP). Los ddNTPs se incorporan a la cadena de ADN, pero impiden la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido debido a la falta del grupo OH en la posición 3' de la ribosa, interrumpiendo el alargamiento del ADN. Este método utiliza fluorescencia como tipo de marcaje y se realizan cuatro mezclas de reacción, cada una con un dNTP marcado con un fluorocromo distinto, ADN polimerasa, un iniciador, el templado de ADN por secuenciar y los 4 ddNTPs.

El fragmento clonado se secuenció empleando un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Genetic Analyzer de Pekín-Elmer). Los iniciadores empleados para la extensión del ADN fueron oligonucleótidos de los promotores T7 y SP6 del plásmido, los cuales flaquean el fragmento de ADN insertado en el vector.

La secuencia obtenida se comparó con la reportada en la literatura, empleando un programa especializado de simulación en línea Biology Workbench. Este paso se realizó con la finalidad de verificar la integridad de la secuencia clonada así como su orientación dentro del vector TOPO TA, con la finalidad de utilizar el promotor T7 del plásmido, el cual deberá encontrarse río arriba a la posición 5′ o amino terminal de la región que codifica al canal TASK-3, para la subsecuente reacción de transcripción.

3.1.8 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO A GRAN ESCALA (Maxiprep)

Una vez que se obtuvo la secuencia y orientación esperada del canal TASK-3 de rata dentro del vector, se llevó a cabo el aislamiento de una mayor cantidad de ADN plasmídico a partir de la clona seleccionada (maxiprep). Se utilizó el kit Plasmid Maxi (QIAGEN, Cat. No. 12162), este método utiliza el mismo fundamento empleado en el miniprep, por lo que la purificación del plásmido a gran escala se llevó a cabo siguiendo el protocolo antes mencionado en el miniprep pero se utilizó una mayor cantidad de reactivos.

El plásmido purificado se analizó digirendolo con la enzima *Hind III*, de acuerdo con la **tabla 3.5**, y por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, observándose la presencia del fragmente con el tamaño esperado.

3.2 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

La transcripción de ADN es el primer proceso de la expresión genética, donde las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa. La transcripción produce ARN mensajero como primer paso de la síntesis de proteínas. Para la reacción de transcripción *in vitro* del canal TASK-3 de rata se utilizó el kit mMESSAGE Mmachine (Ambion Company, Cat. No. 1344).

El procedimiento se llevó a cabo en cuatro etapas siguiendo los pasos del protocolo y bajo las condiciones adecuadas para no contaminar la reacción con ARNasas:

- A) Preparación del templado de ADN
 - El plásmido se digirió con la enzima *BamH I* (New England Biolabs) en el sitio de clonación del vector, río arriba de la posición 3' a la región que codifica al canal TASK-3. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo con la tabla 3.6, la cual se incubó a 37°C por 3h.

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Plásmido	2	0.1µg/µL
BSA (100X)	0.5	100μg/μL (1X)
Amortiguador	5	1X
(10X)		
H ₂ O	40.5	-
Enzima	2	20 unidades
Volumen Total	50	_

Tabla 3.6. Componentes de la reacción de digestión con BamH I.

• La reacción de transcripción se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

- Una vez completa la reacción de digestión, se precipitó con la adición de 125μ L de etanol absoluto frío y 5μ L de acetato de sodio (Sigma Aldrich) a una concentración de 3M y un pH = 5.2. Se mezcló y se enfrió a -20°C por 60min.
- Una vez transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 12 880Xg por 15min, se eliminó el sobrenadante, nuevamente se centrifugó por pocos segundos y se eliminó el fluido residual con la punta de la micropipeta. Finalmente se resuspendió el ADN linealizado en H₂O libre de ARNasas, obteniendo una concentración aproximada de 0.5µg/µL.
- B) Reacción de transcripción
 - Para la reacción de transcripción se utilizó la T7 ARN polimerasa que se une al promotor T7, el cual se encuentra río abajo a la posición 5' o región amino terminal que codifica al canal TASK-3.
 - Todos los reactivos fueron descongelados, ligeramente centrifugados y colocados en hielo, con excepción del amortiguador que se adicionó a temperatura ambiente.

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
H ₂ O (libre de ARNasas)	4	
NTP/CAP (2X)	10	1X
Amortiguador (10X)	2	1X
Plásmido linealizado	2	0.05µg/µL
(0.5µg/µL)		
ARN polimerasa	2	-
Volumen Final	20	-

• Se preparó la siguiente mezcla de reacción de acuerdo con la tabla 3.7:

Tabla 3.7. Componentes de la reacción de transcripción.

- Se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta, se centrifugó y se incubó por 1h a 37°C.
- Terminada la reacción de transcripción, se adicionó 1mL de ADNasa I (Ambion), libre de ARNasas, a una concentración de 2U/µL, se mezcló bien y se incubó nuevamente por 15min a 37°C.

- C) Recuperación de ARN
 - Posteriormente, se detuvo la reacción y se precipitó el ARN adicionando 30µL de H₂O libre de ARNasas y 30µL de LiCl (Ambion). Se mezcló y se enfrió por 30min a -20°C.
 - Se centrifugó a 12 880Xg por 15min a 4°C. Cuidadosamente se removió el sobrenadante. Se lavó el sólido con 1mL de etanol al 70%(v/v), se centrifugó, para eliminar los nucleótidos no incorporados y nuevamente se removió el etanol.
- D) Cuantificación del producto de reacción
 - Finalmente se resuspendió el ARN en 70µL de H₂O libre de ARNasas, se cuantificó por absorbancia a una longitud de onda de 260nm, se analizó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se almacenó a -70°C.

3.3 EXTRACCIÓN DE LOS OVOCITOS

Los ovocitos se obtuvieron mediante disección de ranas africanas de la especie *Xenopus laevis*. La rana se anestesió sumergiéndola en agua con hielo por 40min, se le colocó en una cama de hielo y se le cubrió con el mismo a excepción del abdomen. Posteriormente se le realizó una incisión (~0.5cm) en la parte baja del abdomen y se extrajeron uno o dos lóbulos ováricos; la rana se suturó y se aisló por 24h para su recuperación. Éstos se disgregaron mecánicamente con pinzas de disección (Fine Science Tools, Dumont #55) hasta formar pequeños cúmulos de 4 a 6 ovocitos, los cuales se depositaron en una solución fisiológica salina conocida como medio ND-96 a pH = 7.0, para seleccionar únicamente los ovocitos de la etapa V-VI.

Los ovocitos seleccionados se lavaron 4 a 6 veces en una solución con medio OR-2 "libre de calcio" a pH = 7.0 y posteriormente se incubaron en una solución de colagenasa Tipo IV (1mg/mL) de *Clostridium histolyticum* (Sigma, Cat. No. 5138) con medio OR-2 "libre de calcio" en agitación constante por 45min. Finalmente, los ovocitos se lavaron 4 veces con medio ND-96 y se mantuvieron a en una incubadora (Revolutionary Science, RS- IF-201) a 17°C en medio ND-96 con Gentamicina (Genkova) a una concentración de 50µg/mL hasta su utilización, después de 4 a 24h post extracción. El medio se cambió diariamente.

3.4 INYECCIÓN DEL ARN_m

Una vez cuantificado el ARN_m, se inyectaron ~50nL (~2ng) de la subunidad α del canal iónico TASK-3 de rata a cada ovocito de *X. laevis*, previamente preparados para los ensayos electrofisiológicos. Para las micropipetas utilizadas en la inyección del ARN_m se utilizaron capilares de vidrio (VWR Internacional, Cat. No. 53508-400) previamente estirados (SUTTER INSTRUMENT CO., Mod. P-2000) y llenados con una disolución de aceite mineral (SIGMA), el cual se utiliza para tomar fácilmente la pequeña cantidad de ARN_m; las micropipetas se manejaron empleando un microinyector manual (Drummond, digital microdispensers).

3.5 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DEL CANAL TASK-3 DE RATA

Los ovocitos inyectados se incubaron a 17°C por 1 ó 2 días, depositados en el medio ND-96 con gentamicina a una concentración final de 50µg/mL. Todos los ensayos electrofisiológicos se llevaron a cabo empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). El equipo empleado fue un amplificador (Dagan Corporation, CA-1B High Performance Oocyte Clamp), una interfase (Axon, DigiData 1200) y un osciloscopio (GoldStar, ES20).

Los registros de las corrientes del canal se llevaron a cabo empleando dos capilares de vidrio (VWR Internacional, Cat. No. 53432-921). Los capilares de registro, previamente pulidos con calor y estirados, se llenaron con una disolución conductora de KCl 3M y con un electrodo de Ag°/AgCl, únicamente se emplearon los capilares cuya resistencia fuera de 0.3 a 0.5M Ω para el electrodo de voltaje y 0.8 a 1.2M Ω para el electrodo de la corriente. Las mediciones de las corrientes se realizaron a 2KHz y se almacenaron en una

computadora para analizarlos con los programas clampfit versión 5.6 (Axon Instruments) y Microsoft Excel versión 2000.

Las células se observaron a través de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ2T) y los capilares se manejaron con micromanipuladores (World Precision Instruments, M3301).

En todos los experimentos se trabajó con un mínimo de tres lotes diferentes de ovocitos, realizando tres series de experimentos (inyectados con ARN_m , H_2O y sin inyectar), cada uno con un mínimo de cinco diferentes ovocitos, estimulados a diferentes valores de potencial cinco veces. Los ovocitos se mantuvieron en una cámara con 250µL de ND-96 a un pH = 7.4, todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (~20°C).

3.5.1 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL ARN_m

Para determinar si el ARN_m del canal TASK-3 de rata se expresaba en los ovocitos *X. laevis*, estos fueron sometidos a cambios de voltaje conocidos como Protocolo de Pulsos, particulares para cada canal iónico. La expresión heteróloga del ARN_m de este canal de potasio se verificó empleando un protocolo de pulsos en un intervalo de potencial de 80 a - 140mV, en incrementos de potenciales de -20mV, a un tiempo total de registro de 465ms. Se registró la corriente de ovocitos inyectados con ARN_m, con agua y sin inyectar, para observar las corrientes endógenas del mismo y se comparó con la corriente de los ovocitos expresando el canal.

3.5.2 CARACTERIZACIÓN DEL CANAL

Se llevó a cabo un estudio de caracterización electrofisiológica de TASK-3, con el fin de determinar si el canal iónico se expresaba de manera funcional en la membrana de los ovocitos. En este estudio los ovocitos fueron estimulados con pulsos de voltaje en un intervalo de potencial de 80 a -130mV, con variaciones de -30mV, en un tiempo total de registro de 465ms.

Primero se trabajó a diferentes concentraciones externas de potasio ($[K^+]_e$): 2, 10, 30, 80 y 102mM, en ND-96 a pH = 7.5 (variando directamente Na⁺/K⁺), con el fin de comprobar que TASK-3 es un canal rectificador saliente, selectivo a iones K⁺.

Posteriormente, se varió el valor del pH extracelular (pH_e): 7.50, 7.00, 6.50, 6.12, 5.66; empleando como medio ND-96; debido a que el canal TASK-3 es sensible a los cambios de pH.

Finalmente, para confirmar la identidad de los canales iónicos, se utilizan bloqueadores o activadores. Por lo que en este trabajo se utilizó bario $[Ba^{2+}]$, como $BaCl_2$ (Mallinckrodt, R.A.), a diferentes concentraciones: 1µM, 0.03, 0.1, 3mM y oxicloro de rutenio amoniacal ó rojo de rutenio [RR] (Sigma-Aldrich, R.A.) a 0.03, 0.1, 3, 10µM, en ND-96 a pH = 7.5.

3.6 EFECTO DEL VENENO DE ALACRÁN EN EL CANAL DE POTASIO TASK-3

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas, empleando la técnica de TEVC.

Se probaron fracciones liofilizadas del veneno puro de *Centruroides limpidus limpidus* (*Cll*) y fracciones puras del veneno de *Hadrurus gertschi* (*Hg*) y *Opisthacanthus cayaporum* (*Oc*). El veneno puro fue proporcionado por el Dr. Lourival D. Possani Postay y las fracciones puras por la Dra. Elizabeth Schwartz. Todas las fracciones se purificaron previamente por medio de cromatografía de exclusión molecular, mientras que las fracciones puras se separaron además por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP). La obtención y separación de las diferentes fracciones se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Las fracciones se resuspendieron en H₂O desionizada y se agregaron directamente en la cámara de perfusión en una relación de $\sim 22\mu g/\mu L$ para el veneno total de *C. limpidus limpidus* y de $\sim 0.244\mu g/\mu L$ para las fracciones puras de los otros venenos, en medio ND-96 a pH = 7.4. La corriente de los ovocitos expresando el canal iónico se registraron antes, durante y después de agregar las fracciones de los venenos de alacrán. Después adicionar y probar el efecto de las fracciones, se perfundió el ovocito con al menos 3mL de medio ND-96, para retirar algún rastro de la fracción.

Debido a que el canal TASK-3 de rata presentó un ligero comportamiento llamado lavado de corriente (la corriente disminuye lentamente con el tiempo), los ovocitos se estimularon con un protocolo de pulsos especial para disminuir este fenómeno. Se utilizó un protocolo de pulsos a un mismo valor de potencial de 80mVcon un tiempo total de registro de 465ms, repitiéndose cada 3s, efectuándose un promedio de 260 episodios por corrida y se trabajó a un potencial de mantenimiento de -80mV.

To dos los experimentos se trabajaron por duplicado y a temperatura ambiente (~20°C).

4. RESULTADOS

4.1 CLONACIÓN DE TASK-3 DE RATA

4.1.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (ARN_T)

En la **figura 4.1** se muestra la integridad de siete muestras del ARN_T extraídos a partir del cerebro de rata, por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, observándose claramente las bandas de los ARN ribosomales (ARN_r) 18S y 28S y un barrido correspondiente al ARN_m . Las cantidades de los ARN_T determinadas por espectroscopia UV se presentan en la **tabla 4.1**.



Figura 4.1. Integridad del ARN_T de cerebro de rata por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Las posiciones de los ARN_r 28S y 18S son indicadas a la izquierda del gel.

Muestra No.	Cantidad de ARN _T
1	491.2
2	500.0
3	252.4
4	512.8
5	512.8
6	327.2
7	256.4

Tabla 4.1. Cantidad de ARN_T extraído del cerebro de rata.

Resultados

4.1.2 OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO PARA TASK-3 (RT-PCR).

A partir del ARN_T extraído del cerebro de rata se obtuvó el ADN_c correspondiente a los transciptos de ARN_m. El ADN_c por ser más estable permitió continuar con las etapas subsecuentes de la clonación, por lo que fue amplificado utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia nucleotídica del canal TASK-3 de rata. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, donde se observa en el primer carril el marcador de peso molecular (Invitrogen, Cat. No. 10787-018), en el segundo carril se presenta el control negativo sin la presencia del templado de ADN_c al momento de la amplificación, por lo que no se observó ninguna banda amplificada y en el tercer carril se observa la banda correspondiente al fragmento amplificado de 1188 pb del ADN_c de TASK-3. (**Figura 4.2**).



Figura 4.2. Fragmento obtenido del PCR con oligonucleótidos específicos para TASK-3. En el carril 1: marcador de peso molecular, 2: control negativo y 3: ADN_c amplificado de TASK-3 de rata.

4.1.3 IDENTIFICACIÓN DE CLONAS

El fragmento de ADN amplificado mediante RT-PCR se ligó en el vector TOPO TA y luego se utilizó para la transformación de células químicamente competentes. Algunas colonias obtenidas en la transformación se seleccionaron y posteriormente se purificó el ADN plasmídico. Al fin de comprobar que el plásmido contiene el inserto esperado de TASK-3 de rata, se amplificó por PCR. En la **figura 4.3** se muestra el electroforetograma de los fragmentos amplificados en el PCR de las colonias tamizadas, en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Como se observa en el gel, de siete muestras seleccionadas, en cinco de ellas se encuentra el fragmento esperado (carril 2, 4, 5 6 y 7), pero sólo en dos clonas se encontró ese único fragmento (carril 2 y 4), por lo que la colonia seleccionada para la secuenciación se señala con una flecha.



Figura 4.3. Identificación de clonas con el fragmento TASK-3 de rata por PCR. En el carril 1: marcador de peso molecular de ADN: 100pb (Invitrogen, Cat. No. 10488-058), 2-8: colonias seleccionadas. Flecha señalando el fragmento seleccionado para secuenciación.

Como un segundo procedimiento para corroborar la presencia del fragmento deseado y aprovechando que los oligonucleótidos específicos para TASK-3 contiene el sitio de corte de la enzima de restricción *Hind III*, se digirió el plásmido de la colonia seleccionada. En la **figura 4.4** se presenta el gel de agarosa al 2%, donde se observa en el primer carril el marcador de peso molecular, en el segundo carril el plásmido sin digerir, como control de la reacción de digestión y en el tercer carril se presentan dos bandas donde la superior correspondiente al plásmido digerido, sin la presencia del fragmento deseado y la banda inferior presenta el fragmento clonado de 1188pb. Con este procedimiento nuevamente se comprobó la presencia del fragmento deseado en la clona seleccionada para la secuenciación.



Figura 4.4. Identificación de la clona con el fragmento TASK-3 de rata por digestión con la enzima *Hind III.* En el carril 1: marcador de peso molecular de ADN (100pb), 2: plásmido sin digerir, 3: plásmido digerido y fragmento esperado.

4.1.4 SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO CLONADO

El plásmido purificado, de la clona seleccionada, se utilizó para realizar las reacciones de secuenciación. Se prepararon dos reacciones, utilizando los iniciadores SP6 como "sentido" y T7 como "antisentido", secuencias que flanquean el sitio de clonación del vector.

Con el análisis de esta secuencia nucleotídica se verificó que la orientación del canal estuviera bajo el promotor T7. Esta secuencia nucleotídica de la clona seleccionada tienen una identidad del 99.3 % con respecto a la secuencia de ADN_c del canal iónico de potasio TASK-3 de rata reportado en la base de datos (NCBI: NM_053405). El análisis computacional mostró la presencia de un marco abierto de lectura que comienza en el codón atg en la posición marcada como 1 y que continúa hasta la posición 1194, donde se encuentra el codón de terminación taa. La estructura primaria y secundaria de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica indicó que la proteína consiste de 397 aminoácidos. En la **figura 4.5** se presenta la secuencia nucleótidica y de aa de la región que codifica al canal TASK-3 de rata clonado. Además de observar las características previamente descritas, se presenta con letras en color verde las diferencias que existen en la secuencia clonada con respecto a la reportada. A pesar de estas diferencias

no se afectó el marco de lectura en la secuencia nucleotídica, por lo que estos resultados son consistentes con las características previamente descritas del canal.

	cgaatte	gggc	cctc	taga	itgca	atgct	cga	gcgg	JCCG	ccag	gtgtg	jatgo	gatat	tctgo	caga	attc	gcco	ctt <u>cc</u>	caagct	tgccacc
	M K	R	Q	Ν	V	R	т	L	S	L	I	А	С	т	F	т	Y	L	L	
1	atgaa	gcg	gca	gaa	cgt	gcg	tac	cct	gtc	ctt	gat	cgc	ctg	tac	ctt	cac	cta	cct	gctg	60
	V G	А	А	V	F	D	А	L	Е	S	D	Η	Е	М	R	Е	Е	Е	K	
61	gtggg	tgc	cgc	ggt	gtt	cga	cgc	cct	cga	gtc	gga	cca	tga	gat	gcg	cga	lgga	gga	gaaa	120
	L K	А	Е	Е	V	R	L	R	G	Κ	Y	Ν	I	S	S	D	D	Y	Q	
121	cttaa	age	aga	aga	ggt	ccg	cct	cag	agg	caa	gta	caa	cat	cag	ctc	cga	ltga	cta	ccag	180
	QL	Е	L	V	I	L	Q	S	Е	Ρ	Н	R	А	G	V	Q	W	Κ	F	
181	cagct	gga	gct	ggt	aat	cct	gca	gtc	tga	gcc	cca	ccg	cgc	tgg	tgt	cca	gtg	gaa	gttc	240
	A G	S	F	Y	F	А	I	Т	V	I	Т	Т	I	G	Y	G	Η	А	А	
241	gccgg	gtc	ctt	cta	ctt	cgc	tat	cac	tgt	cat	cac	aac	tat	cgg	ata	tgg	aca	tgc	tgca	300
	P G	Т	D	А	G	Κ	А	F	С	М	F	Y	А	V	L	G	I	Ρ	L	
301	cctgg	aac	cga	tgc	tgg	caa	ggc	ctt	ctg	tat	gtt	cta	tgc	tgt	gct	ggg	Itat	CCC	tctg	360
	ТL	V	Μ	F	Q	S	L	G	Е	R	М	Ν	Т	F	V	R	Y	L	L	
361	acgct	ggt	tat	gtt	cca	gag	cct	aaa	cga	gcg	cat	gaa	cac	ctt	cgt	gcg	rcta	cct	gctg	420
	K R	I	Κ	Κ	С	С	G	М	R	Ν	Т	Е	V	S	М	Е	Ν	М	V	
421	aaacg	gat	caa	gaa	gtg	ctg	tgg	cat	gcg	caa	cac	tga	agt	ttc	tat	gga	gaa	cat	ggtg	480
	T V	G	F	F	S	С	Μ	G	Т	L	С	L	G	Α	Α	Α	F	S	Q	
481	accgt	cgg	ctt	ctt	ttc	ttg	cat	aaa	cac	cct	gtg	cct	tgg	ggc	ggc	tgc	ctt	ttc	ccag	540
	C E	D	W	S	F	F	Η	A	Y	Y	Y	С	F	Ι	т	\mathbf{L}	Т	Т	I	
541	tgcga	aga	ttg	gag	ctt	ctt	cca	cgc	tta	cta	cta	ctg	ctt	cat	tac	act	gac	tac	tata	600
	G F	G	D	F	V	A	L	Q	S	Κ	G	A	L	Q	R	Κ	Ρ	F	Y	
601	gggtt	cgg	cga	ctt	tgt	ggc	cct	gca	atc	caa	aaa	tgc	cct	gca	gag	gaa	gcc	att	ctac	660
	V A	F	S	F	Μ	Y	Ι	L	V	G	L	Т	V	Ι	G	A	F	L	Ν	
661	gtggc	ctt	cag	ctt	cat	gta	tat	cct	ggt	aaa	cct	gac	cgt	cat	cgg	tgc	ctt	cct	caat	720
	L V	V	\mathbf{L}	R	F	L	т	Μ	Ν	Т	D	Е	D	L	L	Е	G	Е	V	
721	cttgt	ggt	cct	gcg	att	cct	gac	cat	gaa	tac	cga	tga	aga	tct	tct	gga	ggg	aga	agtt	780
	A Q	I	\mathbf{L}	А	G	Ν	Ρ	R	R	V	V	V	R	V	Ρ	Q	S	R	K	
781	gcgca	gat	act	tgc	tgg	aaa	CCC	aag	acg	ggt	ggt	tgt	ccg	tgt	gcc	tca	gag	tcg	caag	840
	R H	Η	Ρ	М	Y	F	L	R	Κ	Y	G	R	Т	L	С	Y	\mathbf{L}	С	F	
841	aggca	cca	CCC	cat	gta	ctt	cct	cag	gaa	ata	cgg	ccg	aac	cct	gtg	cta	tct	ctg	cttc	900
	ΡG	A	Ν	W	G	D	D	D	D	D	D	D	D	Α	V	Е	Ν	V	V	
901	cctgg	tgc	caa	ctg	aaa	tga	tga	tga	tga	cga	tga	tga	tga	cgc	cgt	cga	gaa	tgt	cgta	960
	VТ	Т	Ρ	V	Ρ	Ρ	A	V	A	A	A	A	A	Α	A	A	Т	Ρ	G	
961	gttac	tac	tcc	tgt	tcc	tcc	tgc	tgt	tgc	tgc	tgc	tgc	tgc	tgc	tgc	tgc	tac	tcc	tggt	1020
	P S	Т	R	Ν	V	R	A	Т	V	Η	S	V	S	С	R	V	Е	Е	I	
1021	cccag	tac	cag	gaa	tgt	ccg	ggc	tac	agt	cca	ctc	ggt	ttc	ctg	cag	ggt	tga	aga	gatc	1080
	P P	D	V	L	R	Ν	т	Y	F	R	S	Р	F	G	A	I	Ρ	Р	G	
1081	cctcc	gga	cgt	gct	gag	gaa	cac	cta	ctt	ccg	gtc	CCC	att	cgg	cgc	cat	CCC	tcc	tgga	1140
	МН	Т	С	G	Е	Ν	Н	R	L	Η	I	R	R	K	S	I	*			
1141	atgca	cac	ctg	cgg	gga	aaa	сса	cag	gct	gca	cat	ccg	tcg	caa	gtc	cat	cta	aaa	gcttaa	1194
	qqcqa	att	cca	qca	cac	tqq	cqq	ccq	tta	cta	qtq	gat	ccq	aqc	tco	iqta	icca	aqc	ttgat	
	gcata	get	qat	ttt		20	20	5					2	5	_			<u> </u>	0	
	5	5																		

Figura 4.5. Secuencia nucletídica y de aminoácidos de la región codificadora de la clona de ADNc de TASK-3 de rata. El codón de iniciación (M: atg) y el de termino (* : taa) se muestran en letras rojas, la secuencia obtenida empleando el oligonucleótido T7 corresponde a las letras azules, SP6 letras moradas, la región donde las dos secuencias coincidieron en letras azul claro; las diferencias de aa y Resultados

nucleótidos se muestran en color verde y las regiones utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos 5' y 3' se muestran subrayadas.

4.2 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

Una vez obtenido el plásmido con la secuencia de TASK-3, este se utilizó para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* con el fin de obtener el ARN_m que codifica para el canal de potasio TASK-3 de rata. Como primer paso se linearizó el plásmido que contiene la secuencia del canal iónico con la enzima *BamH I*. El producto de la reacción de digestión se analizó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, observando en el primer carril el plásmido sin digerir, como control de la reacción de digestión y en el segundo carril la banda corresponde al plásmido digerido (**Figura 4.6**).



Figura 4.6. Producto de la reacción de linearización enzimática del plásmido. En el carril 1: plásmido sin digerir, 2: plásmido linealizado.

El plásmido linealizado se utilizó obtener el ARN a través de la reacción de transcripción *in vitro* con la T7 ARN polimerasa. El producto se cuantificó espectrofotométricamente a 260nm dando una cantidad de 266.8 μ g/ μ L y también se analizó cualitativamente mediante un gel de agarosa al 2% para verificar su calidad. Como se observa en la **figura 4.7** no existe degradación del ARN_m, ya que se observa únicamente una banda bien definida.



Figura 4.7. Producto de la reacción de transcripción *in vitro* con la T7 ARN polimerasa. Se presenta el ARN_m correspondiente al canal de potasio TASK-3 de rata.

A través de estas pruebas se determinó que la cantidad y calidad del ARN_m del canal TASK-3 de rata era adecuada para utilizarse en la expresión heteróloga del canal iónico en ovocitos de *X laevis*.

4.3 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL CANAL IÓNICO TASK-3 DE RATA EN OVOCITOS

Los ovocitos utilizados para la expresión heteróloga del canal iónico se trataron previamente con colagenasa y se inyectaron con el ARN_m del canal de potasio TASK-3 de rata, después de 4 a 24h post-tratamiento. Se inyectaron 50nL (2ng de ARN_m) a cada célula y se mantuvieron a 17°C. Las células se estimularon mediante un protocolo de pulsos específico para el canal TASK-3, como se mencionó en los procedimientos experimentales.

Para observar la expresión del canal, se compararon las corrientes de los ovocitos inyectados con el ARN_m del canal TASK-3 y la de los ovocitos nativos, inyectados con agua y sin inyectar (**Figura 4.8**, Trazos I = f(t)).



Figura 4.8 Expresión del ARN_m **de TASK-3.** Trazos I = f(t) a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con H₂O y sin inyectar (A), ovocitos inyectados con el ARN_m del canal TASK-3 (B). Los ovocitos se estimularon con pulsos de potencial de 80 a -140mV y variaciones de -20mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV, el tiempo total de registro fue de 465ms.

Se observa en la **Figura 4.8**, que existe una diferencia marcada entre las corrientes endógenas de los ovocitos (menores a 1 μ A) y aquellos que fueron inyectados con el ARN_m del canal TASK-3 (mayores a los 7 μ A). Esto indica que hubo una expresión adecuada del ARN_m que se inyectó en la célula, de tal forma que al estimular el canal iónico con el protocolo de pulsos éste se abrirá permitiendo evaluar la apretura como una corriente específica.

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL CANAL TASK-3

Una vez que se determinó la expresión del ARN_m , se llevó a cabo la caracterización del canal TASK-3 de rata, con el fin de corroborar si el canal se expresaba de forma funcional en la membrana de los ovocitos.

4.4.1 COMPORTAMIENTO "LAVADO DE CORRIENTE"

En todos los registros realizados con ovocitos expresando el canal de potasio TASK-3 se observó que el valor de la corriente, a cualquier pulso de potencial, no se mantuvo constante, el cual disminuyó lentamente con el transcurso del tiempo, lo cual nos indica que el canal clonado tiene un comportamiento de "lavado de corriente". En la **gráfica 4.1** (Curva I = f(t)) se representa este fenómeno, con una disminución de la corriente máxima (I_{max}) de aproximadamente el 4%, en un tiempo de 300s (n = 5).



Gráfica 4.1 Disminución en la corriente de TASK-3 por el fenómeno de lavado de corriente. Curva I = f(t). Ovocito estimulado con un pulso continuo de potencial de 80mV, cada 3s, a un potencial de mantenimiento de -80mV.

Debido a que el comportamiento de lavado de corriente fue mínimo, este se considero despreciable, debido a que el tiempo promedio por experimento fue de 780s, por lo que no se realizó ninguna corrección de la corriente sobre los resultados obtenidos en la caracterización del canal y en el efecto del veneno de alacrán sobre el canal de potasio TASK-3.

4.4.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE POTASIO

Primero se analizó el efecto de la concentración externa de potasio $([K^+]_e)$ sobre las corrientes generadas en la expresión del canal TASK-3. Trabajando a $[K^+]_e = 2mM$, se observó únicamente la generación rápida de corrientes salientes ($7.5 \pm 1.5\mu$ A) activadas a potenciales depolarizantes (80mV), en contraste, se observaron corrientes pequeñas ($-0.14 \pm 0.02\mu$ A) activadas a potenciales hiperpolarizados (-130mV) (**Figura 4.9A**, Trazos I = f(t)). Este mismo comportamiento se aprecia a una $[K^+]_e = 102mM$, sin embargo las corrientes activadas a potenciales depolarizantes fueron menores ($5.5 \pm 1.3\mu$ A), generándose corrientes entrantes mayores a las anteriores ($-1.3 \pm 0.5\mu$ A) a potenciales hiperpolarizados (n = 5) (**Figura 4.9B**, Trazos I = f(t)).



Figura 4.9 Diferencia en las corrientes generadas variando $[\mathbf{K}^+]_e$ a diferentes potenciales. Trazos I = f(t) a diferentes pulsos de potencial. Se muestran los registros de las corrientes obtenidas de un ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a $[\mathbf{K}^+]_e = 2\text{mM}$ (A) y las corrientes de ese mismo ovocito en presencia de $[\mathbf{K}^+]_e = 96\text{mM}$ (B). Los ovocitos fueron estimulados con pulsos de potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV, el tiempo total de registro fue de 465ms.

A partir de los datos obtenidos en la **figura 4.9**, se puede observar que variando e incrementando $[K^+]_e$ entre 2 y 102mM (reemplazando directamente Na⁺/K⁺), el potencial se desplazó hacia un potencial de inversión de 0mV y a bajas $[K^+]_e$ sólo una pequeña corriente entrante fue detectada, (**Gráfica 4.2**: Curvas I/I_{max} ($[K^+]_e = 2mM$) = f(E)). Por lo que la corriente en función del potencial inducida por el protocolo de pulsos, indica que TASK-3 es un canal rectificador saliente, selectivo a iones potasio (K⁺).



Gráfica 4.2 Selectividad del canal TASK-3 a los iones K⁺. Curvas $I/I_{max} ([K]_{e} = 2mM) = f(E)$, a diferentes concentraciones de $[K^+]_e = 2$, 30 y 102mM, correspondiente a la figura 4.9. Los ovocitos se estimularon con potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV, n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

Como podemos observar en la **gráfica 4.3** (Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f([K^+]_e))$, a medida que aumenta la concentración de potasio externa, la corriente del canal TASK-3 disminuye a potenciales depolarizantes (80mV), reduciendo la salida de K⁺ al medio

exterior; sin embargo, a potenciales hiperpolarizados (-130mV) este mismo efecto se debe a la entrada de K^+ a la célula.



Gráfica 4.3 Dependencia de la corriente de TASK-3 a la $[\mathbf{K}^+]_{e}$. Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f([\mathbf{K}^+]_e)$ a dos diferentes pulsos de potencial 80 y -130mV. Los ovocitos se estimularon con potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV; n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

4.4.3 SENSIBILIDAD A LA VARIACIÓN DEL pH EXTERNO

Al analizar el efecto del pH externo (pH_e) se observó que las corrientes del canal de potasio TASK-3 son altamente sensibles a la variación de éste. Como se puede apreciar en la **figura 4.10** (trazos I/I_{max} (E = 80mV, pHe = 7.5) = f(t)), al aumentar el nivel de acidez la actividad del canal se inhibe, observándose una disminución en la corriente de aproximadamente 80%, a un valor de pH_e = 5.66.



Figura 4.10 Sensibilidad de TASK-3 al pH externo. Trazos $I/I_{max (E = 80mV, pHe = 7.5)} = f(t)$ a diferentes valores de potencial. Se muestran los registros de las corrientes normalizadas obtenidas de un ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH = 7.50 (A) y las corrientes de ese mismo ovocito a un pH = 5.66 (B). Los ovocitos fueron estimulados con pulsos de potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV, el tiempo total de registro fue de 465ms.

A partir de los datos obtenidos de la **figura 4.10** se realizó la **gráfica 4.4** (Curvas de I/I_{max} (E = 80 mV, pHe = 7.5) = f(E)), donde se muestra la corriente normalizada en función del potencial. Podemos observar la inhibición de la corriente por acidificación (7.50-5.66), sin observar ningún desplazamiento en el potencial reverso.



Gráfica 4.4 Sensibilidad de TASK-3 al pH externo Curvas I/I_{max} (E = 80mV, pHe = 7.5) = f(E) a diferentes valores de pH_e, correspondiente a la figura 4.10. Corrientes registradas de ovocitos expresando TASK-3 en respuesta a los pulsos de voltaje a diferentes valores de pH_e: 7.50, 6.50 y 5.66. Los ovocitos fueron estimulados con potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV; n =5. Las barras representan la desviación estándar.

Variando el pH_e, en un intervalo de 8.00 a 5.66, se observó la corriente máxima a un valor de 7.50 (E = 80 mV), pero a pH_e = 8.00, la corriente disminuyó ligeramente, posiblemente este comportamiento es debido a la protonación del grupo amino de la histidina 98, afectando débilmente la conductancia y frecuencia de apertura en el canal. Sin embargo, cuando se trabajó a pH_e = 5.66, algunos ovocitos no resistían y la célula se moría, ya que a ese valor de pH la membrana se dañaba y esto impedía seguir trabajando (**Gráfica 4.5**: Curva I/I_{max} (E=80mV, pHe = 7.5) = $f(pH_e)$).



Gráfica 4.5 Dependencia de la corriente de TASK-3 al pH externo. Curva I/I_{max} (E=80mV, pHe=7.5) = $f(pH_e)$. Inhibición de la corriente registrada a 80mV por el pH_e a seis diferentes valores: 8.00, 7.50, 7.00, 6.50, 6.12 y 5.56. Los ovocitos se estimularon con potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV; n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

A una misma concentración de potasio externa, la inhibición de la corriente por el pH_e, parece ser independiente del potencial de membrana. Si se normaliza la corriente a diferentes potenciales, se observa que a valores de pH_e = 7.5, 8.0 y 6.5, la corriente no es dependiente del voltaje entre los potenciales de membrana de -40 y +80mV, la corriente se mantiene prácticamente constante en cada uno de los pH estudiados. A valores de pH_e = 6.12 y 5.66 al parecer existe una ligera dependencia de la corriente por el voltaje entre esos mismos valores de potenciales de membrana, pero este resultado no es estadísticamente significativo (**Gráfica 4.6**: Curvas $I/I_{max (pH = 7.5)} = f(E)$).



Gráfica 4.6 El efecto del pH_e sobre las corrientes de TASK-3 es independiente del voltaje. Curvas $I//I_{max (pH = 7.50)} = f(E)$, a diferentes valores de pH_e = 7.50, 8.00, 6.50, 6.12, 5.66; n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

4.4.4 EFECTO BLOQUEDOR DEL BARIO Y ROJO DE RUTENIO

Como se observa en la **figura 4.11** (trazos I/I_{max} (E = 80 mV, $[Ba^{2+}]_{e \text{ o } [RR]e = 0 \text{mM}}$) = f(t)), al adicionar una $[Ba^{2+}]_e$ de 3mM la corriente disminuyó aproximadamente 44 % y 72% al adicionar una $[RR]_e$ de 30 μ M con respecto al registro control sin la adición del bloqueador. La adición externa tanto de bario ($[Ba^{2+}]_e$) como de oxicloro de rutenio amoniacal ó rojo de rutenio $[RR]_e$ bloquean al canal TASK-3.

Al trabajar con bario se observó que además de afectar la activación de la corriente por inhibición, modifica cinéticamente las corrientes de TASK-3, como se observa en el trazo correspondiente a la $[Ba^{2+}]_{e}$, señalado con una flecha (**Figura 4.11**). Sin embargo este cambio en la cinética de apertura del canal no es objeto de este trabajo, por lo que no se realizó ningún análisis para el estudio de este fenómeno.



Figura 4.11 Inhibición de las corrientes de TASK-3 por $[Ba^{2+}]_e y [RR]_e$. Trazos $I/I_{max} (E = 80mV, [Ba^{2+}]_e y [RR]_e = 0) = f(t)$, a diferentes valores de potencial. Se muestran los registros de las corrientes normalizadas obtenidas de un ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH = 7.5 en ausencia de $[Ba^{2+}]_e y [RR]_e$ (control); las corrientes de esos mismos ovocitos a una $[Ba^{2+}]_e = 3mM y [RR]_e = 30\mu M$. La flecha indica la modificación cinética del Ba^{2+} sobre las corrientes de TASK-3. Los ovocitos fueron estimulados con pulsos de potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV.

A partir de los registros obtenidos de la **figura 4.11**, se realizaron las **gráficas 4.6** (Curvas $I/I_{\text{max ([Ba}^{2+}]e \text{ y }[RR]e = 0\text{ mM})} = f(E)$), donde podemos observar el efecto inhibidor de la corriente por $[Ba^{2+}]_e$ y $[RR]_e$, sin observar ningún desplazamiento en el potencial de inversión, ya que este se mantiene constante.



Gráficas 4.7 Sensibilidad de TASK-3 a la [Ba^{2+}]_e y [RR]_e. Curvas I/I_{max ([Ba²⁺] y [RR] = 0mM)} = f(E), a diferentes valores de concentración, correspondientes a la figura 4.11. Corrientes registradas de ovocitos expresando TASK-3 en respuesta a los pulsos de voltaje a diferentes valores de $[Ba^{2+}]_e$: 0.0, 0.3, 3.0mM (A) y [RR]_e: 0.0, 1, 30µM (B), n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

Resultados

En las **gráficas 4.8** (Curvas $I/I_{\text{max }(E = 80\text{mV}, [Ba^{2^+}]e \text{ y}[RR]e = 0)} = f(C))$, podemos observar la inhibición de la corriente de TASK-3 al variar la $[Ba^{2^+}]_e$ entre 0.003 a 3mM y $[RR]_e$ de 0.01 a 3µM, el bloqueo se observó desde el momento de adicionar al inhibidor. Cuando se trabajó con bario como bloqueador, a concentraciones mayores a 3mM los ovocitos no resistían los cambios de potencial y la célula se moría; posiblemente a esa concentración el Ba²⁺ daña la membrana; sin embargo, con rojo de rutenio no se observó ese efecto.



Graficas 4.8 Dependencia de la corriente de TASK-3 a la [Ba^{2+}]_e y [RR]_e. Curvas $I/I_{max (E = 80mV, [Ba^{2+}]_e y [RR]_e = 0mM)} = f(C)$. Inhibición de la corriente registrada a 80mV por $[Ba^{2+}]_e$ a cinco diferentes concentraciones: 0.003, 0.01, 0.3, 1.0 y 3mM (A) y $[RR]_e$ a 0.01, 0.3, 1 y 3µM (B). Los ovocitos se estimularon con potenciales de 80 a -130mV y variaciones de -30mV, a un potencial de mantenimiento de -80mV, n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

A una misma concentración de $[K^+]_e$ de 2mM, el valor de la corriente por el efecto bloqueador de bario y rojo de rutenio parece ser independiente del potencial de membrana. Si se normaliza la corriente a diferentes valores de potencial, se observa que esta, a una $[Ba^{2+}]_e = 0.01$ y 0.3mM, así como $[RR]_e = 0.3$, 1.0µM, no es dependiente del voltaje entre los potenciales de membrana de -40 y +80mV, manteniéndose la corriente prácticamente constante. Sin embargo, a $[Ba^{2+}]_e = 1$, 3mM y $[RR]_e = 3.0$, 10.0, 30.0µM, existe una ligera dependencia de la corriente por el voltaje entre esos mismos valores de potenciales, pero estos resultados no son estadísticamente significativos (**Gráfica 4.9**, Curvas I/I_{max} (E = 80mV, $[Ba^{2+}]_e$ y $[RR]_e = 0mM$) = f(E)).



Gráficas 4.9 El efecto de $[Ba^{2+}]_e y [RR]_e$ sobre las corrientes de TASK-3 es independiente del voltaje. Curvas $I/Imax_{(E=80mV, [Ba^{2+}]e y [RR]e=0mM)} = f(E)$, a diferentes valores de concentración de $[Ba^{2+}]_e = 0.0$, 0.01, 0.3, 1.0, 3.0mM (A) y $[RR]_e = 0.0$, 0.01, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ M (B); n = 5. Las barras representan la desviación estándar.

4.5 EFECTO DEL VENENO DE ALACRÁN EN EL CANAL DE POTASIO TASK-3

Una vez analizado el comportamiento de expresión del canal TASK-3 en la membrana de los ovocitos, se probaron las diferentes fracciones del veneno de alacrán con el fin de observar su efecto sobre este canal.

Las fracciones se adicionaron directamente en la cámara de registro, donde se encontraba el ovocito expresando el canal TASK-3 de rata. Los ovocitos se estimularon empleando el protocolo de pulsos descrito en la metodología y las corrientes se registraron continuamente durante los ensayos. Antes de probar las fracciones de veneno de alacrán se midió la estabilidad de la corriente durante un tiempo aproximado de 280s, posteriormente las fracciones se adicionaron y se observó su efecto sobre el canal TASK-3, finalmente se perfundió con al menos 3mL de ND-96, para retirar algún rastro de las fracciones y determinar si la corriente inicial continuaba con su comportamiento original.

En la **figura 4.12** se presenta el cromatograma del fraccionamiento del veneno total de *Centruroides limpidus limpidus* el cual se purificó por medio de una cromatografía mediante exclusión molecular en una columna de 0.9 x 190cm empacada con Sephadex G50 medio; observando la resolución de cuatro fracciones, las cuales se probaron sobre el canal de potasio TASK-3 de rata.

Resultados



Figura 4.12 Cromatograma del veneno total de *Centruroides limpidus limpidus* por exclusión molecular. Se muestran las cuatro fracciones (I-IV) obtenidas en la separación de ~400mg de veneno total de *C. limpidus limpidus* a través de una columna cromatográfica (200 x 0.9cm), empacada con Sephadex G50. La fase móvil estuvo compuesta por amortiguador de acetato de amonio (pH = 4.7, 20mM).

El veneno total de *Centruroides limpidus limpidus (Cll*), dividido en las cuatro fracciones se probó en una relación de ~22µg/µL; en la **gráfica 4.10** (Curva $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$) se presenta la resistencia de la corriente del canal de potasio TASK-3 de rata a la primera fracción, con excepción del momento de adicionar la toxina y de perfundir, prácticamente la corriente se mantuvo a un valor constante durante todo el ensayo, incluso el fenómeno de lavado de corriente no se llega a distinguir, esta fracción no tuvo ningún efecto sobre la corriente del canal, por lo que se considera que no tiene ninguna actividad bloqueadora o activadora.



Gráfica 4.10 La corriente de TASK-3 es resistente a la fracción I del veneno de *Centruroides limpidus*. Curva $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$ a un mismo potencial de 80mV. Ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH_e = 7.5. Adición de la fracción (*), perfusión (\Box). El ovocito fue estimulado con un pulso continuo de voltaje de 80mV cada 3s, a un potencial de mantenimiento de -80mV.

Ese mismo comportamiento se observó en todas las fracciones del veneno de alacrán *C. limpidus*, como se muestra en la **gráficas 4.11** (Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$).



Graficas 4.11 La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones (II-IV) del veneno de *Centruroides limpidus*. Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$ a un mismo valor de potencial de 80mV. Ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH_e = 7.5. Adición de la fracción (*), perfusión (\Box), el valor de cada intervalo de tiempo se representa con una barra. Los ovocitos se estimularon con un pulso continuo de voltaje de 80mV cada 3s, a un potencial de mantenimiento de -80mV.

En la **figura 4.13** se presenta el cromatograma del fraccionamiento de las fracciones puras de *Opisthacanthus cayaporum* (*Oc*) por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP), a través de una columna C_{18} semipreparativa.

Posteriormente cuatro fracciones puras del veneno *Opisthacanthus cayaporum* (*Oc*) se probaron en una relación de 0.244µg/µL, ya que estas fracciones corresponden a picos cromatográficos puros. En las **gráficas 4.12** (Curvas I/I_{max} (E = 80mV) = f(t)), se presenta la resistencia de la corriente de TASK-3 a estas fracciones, observándose el mismo comportamiento.



Figura 4.13 Cromatograma de las fracciones puras de *Opisthacanthus cayaporum* por HPLC-RP. Las fracciones puras (I-IV) se separaron utilizando una columna de fase reversa sempreparativa C_{18} , con gradiente lineal de la solución A (0.12% de ácido trifluoroacético/agua) hasta 60% de la solución B (0.10% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo), en una corrida de 60min, a una velocidad de flujo de 2mL/min.



Gráficas 4.12 La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones puras (I-IV) del veneno de *Opisthacanthus cayaporum*. Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$, a un mismo valor de potencial de 80mV. Ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH = 7.5. Adición de la fracción (*), perfusión (\Box), el valor de cada intervalo de tiempo se representa con una barra. Los ovocitos se estimularon con un pulso continuo de voltaje de 80mV cada 3s, a un potencial de mantenimiento de -80mV.

Resultados

En la **figura 4.14** se presenta el cromatograma del fraccionamiento de las fracciones puras de *Hadrurus gertschi* (*Hg*) por medio de HPLC-RP a través de una columna C_{18} semipreparativa.



Figura 4.14 Cromatograma de las fracciones puras de *Hadrurus gertschi* por HPLC-RP. Las fracciones puras (I-XIV) se separaron utilizando una columna de fase reversa sempreparativa C_{18} , con gradiente lineal de la solución A (0.12% de ácido trifluoroacético/agua) hasta 60% de la solución B (0.10% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo), en una corrida de 60min, a una velocidad de flujo de 2mL/min.

Finalmente se adicionó sobre el canal de potasio TASK-3 de rata catorce fracciones puras (I-XIV) del veneno de alacrán *Hadrurus gertschi* (*Hg*) en una relación de 0.244µg/µL directamente en la cámara de perfusión, sin encontrar ningún efecto de las fracciones sobre el canal (**Gráficas 4.13**, Curvas *I*/*I*_{max (E = 80mV)} = *f*(*t*)).

Se probaron en total 22 fracciones del veneno de tres diferentes especies de alacranes, correspondiendo cuatro de ellas al veneno total de *C. limpidus limpidus*, cuatro a fracciones puras del veneno de *O. cayaporum* y 14 fracciones puras correspondientes al veneno de *H. gertschi*, sin presentar ninguna actividad bloqueadora o activadora visible sobre el canal de potasio TASK-3 de rata.



Gráficas 4.13 La corriente de TASK-3 es resistente a las fracciones (I-XIV) del veneno de *Hadrurus gertschi*. Curvas $I/I_{max (E = 80mV)} = f(t)$, a un mismo valor de potencial de 80mV. Ovocito inyectado con ARN_m del canal en ND-96 a pH = 7.5. Adición de la fracción (*), perfusión (\Box), el valor de cada

Resultados

intervalo de tiempo se representa con una barra. Los ovocitos se estimularon con un pulso continuo de 80mV cada 3s, a un potencial de mantenimiento de -80mV. A

5. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, el canal de potasio TASK-3 pertenece a una nueva familia de canales de K⁺ de 4TM/2P, el cual es sobreexpresado en algunas líneas de células cancerígenas y también se encuentra relacionado en la apoptosis. Sin embargo, aún no se ha encontrado ningún ligando natural que actúe sobre este tipo de canales. Dada la importancia de este canal se decidió realizar este trabajo con el propósito de determinar si en el veneno de los alacranes *Centruroides limpidus limpidus, Hadrurus gertschi, y Opisthacanthus cayaporum* existen toxinas que actúen sobre este canal.

5.1 CLONACIÓN DE TASK-3

Para clonar el canal de potasio TASK-3, se extrajo el ARN_T del cerebro de rata ya que se ha reportado su expresión abundante en dicho tejido (Kim, 2005), pues contribuye a fijar el potencial de reposo en las membranas neuronales. El ADN_c clonado tiene un tamaño de 1194 nucleótidos y codifica para una proteína de 397 aminoácidos, dos aa más de la secuencia reportada. La secuencia de aminoácidos obtenida se comparó con la reportada en la base de datos (NCBI: NM_053405)¹ siendo prácticamente idéntica (98.7%). En la **figura 5.1** se presenta el alineamiento de las secuencias de aminoácidos, tanto de la secuencia clonada como de la reportada para el canal TASK-3 de rata, donde se observan claramente estas diferencias, las cuales se encuentran principalmente en medio del tercer segmento transmembranal. Se insertó un aminoácido de más: la treonina (T) en la posición 197 y se observan tres sustituciones de aa: valina (V) por cisteína (C), prolina (P) por leucina (L) y triptofano (W) por glicina (G) en las posiciones 199, 200 y 201 respectivamente. Todos los aminoácidos sustituidos son no polares, con excepción de la cisteína que es un aa polar sin carga. Finalmente se observa la inserción de una alanina (A) en la posición 336 la cual se

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed

encuentra ubicada al final de la cadena, en el lado carboxilo terminal, junto a una serie de siete alaninas.

MKRQNV	RTLSL	IACTF	TYLLV	GAAV	FDALE	SDH	EMRE	EEKL	KAEE	VRLF	GKYI	NISSI)DYQ
:::::	:::::	:::::	:::::	::::	:::::	:::	::::	::::	::::	::::	:::	::::	::::
MKRQNV	RTLSL	IACTE	TYLLV	GAAV	7FDALE	SDH	EMRE	EEKL	KAEE	VRLF	GKYI	NISSI	DYQ
	10		20		30	5		40		5	50		60
QLELVI	LOSEP	HRAGV	QU <mark>KF A</mark>	GSF1	FAIT		IGYG	HAAP	GTDA	GKAF	CMFY	AVLG	IPL
:::::	:::::		: : : : :	::::	:::::	:::	::::	::::	::::	::::	::::		:::
QLELVI	LOSEP	HRAGV	QU <mark>KF A</mark>	GSFN	FAIT	/ITT	IGYG	HAAP	GTDA	.GKAF	CMFY	ZAVLG	JPL
	70		80		90)		100		11	0		120
TLVMEO	SLOFP	1. 1	יע דע כ	סדעע	CCGMD	NPP R 3			NARR'	SCMG	EL CL	C 0 0 01	rsoc
								4 <u>110 1 0</u>				<u></u>	<u></u>
TLVMFO	SLGERM	INTEVE	 . VI. I. KI	R TKK	CCGMR	NTF 3	753 MF N		•••• প্রিহাস	 ЗСМС-	1.170	та а ат	
	130		140		150		11110.1	160		17	70	w AA A	190
	100		110		100		-	.00		T	10		100
EDWSFF	HAYYY	CFITL	TTIGE	GDFV	ALOSE	GAL	ORKP	FYVA	FSFM	IYILV	GLT	JIGAF	LNL
EDWSFF	HAYYY	CFITL	TTIGE	GDFV	ALOSE	GAL	ORKP	FYVA	FSFM	IYILV	GLT	JIGAF	LNL
	190		200		210)	_	220		23	0		240
						_							
VVLRFL	TMNTD	EDLLE	GEVAQ	ILAG	NPRRV	WVR	VPQS.	RKRH	нрмү	FLRK	YGRI	LC AT	CFP
:::::	:::::			::::	::::	:::				::::	::::	::::	:::
VVLRFL	TMNTD	EDLLE	GEVAQ	ILAG	NPRRV	WVR	VPQS.	RKRH	HPMY	FLRK	YGRI	LC AT	CFP
	250		2 60		270)		280		29	U		300
GANNGDI	תתתתת	D 837FN	BAAT	וסזוסי	5 6 7 7 6 C		ነልልጥፑ	осрат	נזמאסי	2 A TT 7 F	19779	CRITE	TDD
GANNGDI	ת תחת חו	0.037FN	87877	 PD17D1	 		0.0-TE		'DNR7		 19179	CRITE	 7 T D D
OMMODI	310	DAVEN	320	II VII	330	~~~~		340	144.01	35	50	CINVEI	360
	510		520		000			5 10					000
DVLRNT	YFRSPI	FGAIP	PGMHT	CGEN	HRLHI	RRK	SI						
:::::	:::::			::::	:::::	:::	::						
DVLRNT	YFRSPI	FGAIP:	PGMHT	CGEN	HRLHI	RRK	SI						
	370		380		390)							

Figura 5.1 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos: clonada y reportada. Se presenta en la parte superior la secuencia de aminoácidos clonada en este trabajo comparada con la secuencia reportada, parte inferior (NCBI:NM_053405) del canal TASK-3 de rata. Los aminoácidos que pertenecen a los segmentos transmembranales se encuentran subrayados y los formadores del poro se encuentran con letras azules. Los aminoácidos diferentes se presentan en letras rojas.

Recientemente se reportó que una mutación puntual (M159A) al inicio del tercer segmento transmembranal del canal de potasio TASK-3 de humano, que tiene una identidad de aproximadamente el 74% con el canal TASK-3 de rata, elimina la sensibilidad por anestésicos volátiles y reduce la actividad del canal, sin afectar su sensibilidad al pH_e (Andres-Enguix, *et al.*, 2007). Sin embargo, en la secuencia de aa clonada del canal TASK-
3 de rata al inicio del tercer segmento transmembranal se presenta también una M, la cual permaneció inalterada en la secuencia del canal. La inserción y sustitución de estos aminoácidos no afectó la expresión del canal y por la posición de estas mutaciones puntuales se piensa que no alterarían su función; lo que nos permitió continuar con los pasos subsecuentes del proyecto sin tener duda alguna de la integridad en la secuencia del canal TASK-3 de rata.

5.2 EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TASK-3

El canal de potasio TASK-3 ha sido expresado en células COS-7, HEK293 y en ovocitos de *X. laevis*, formando un canal de potasio funcional (Chapman *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). En este trabajo, el canal TASK-3 de rata se expresó y caracterizó en ovocitos de la rana *X. laevis* por el fácil manejo de estas células. Se siguió el protocolo para trabajar con estas células (Wagner *et al.*, 2000), donde el ARN_m se sintetizó a partir del ADN_c obtenido y cerca de 2ng se inyectaron en cada ovocito desfoliculado; después de 24h se observó la expresión de los canales empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). Se registraron corrientes alrededor de los 10µA en ovocitos inyectados con ARN_m, en comparación con los ovocitos controles, inyectados con H_2O o sin inyectar, que presentaron siempre corrientes menores a 0.2µA a un potencia de 80m*V*, por lo que la expresión del canal se llevó a cabo de forma exitosa como se encuentra reportado en la literatura (Kim, 2005).

El canal TASK-3 se expresa de forma funcional en los ovocitos de *X. laevis*, debido a que nuestros datos concuerdan con los datos reportados en la literatura a cerca del comportamiento de este canal expresado en ovocitos. De acuerdo a lo publicado por Chapman, *et al.* y Rajan *et al.* (2000) TASK-3 es un canal selectivo a iones potasio debido a que el potencial se desplaza hacia un valor de 0mV cuando aumenta la concentración de potasio externa.

La sensibilidad al pH extracelular es una propiedad característica de este tipo de canales. Se ha reportado que a un valor de pH_e = 7.4 se observa la corriente máxima, la cual disminuye ~75% a un valor de pH_e de 6.5 (Kim *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2000). Tal

como se indica, el canal TASK-3 clonado es sensible a la variación del pH_e, ya que a medida que aumenta el nivel de acidez en el medio, el valor de las corrientes disminuye. La corriente máxima se presentó a un valor de pH_e de 7.5, y disminuyó ~80% cuando se trabajó a pH_e = 5.66; a este valor de pH algunas células no resistían y morían, ya que la membrana del ovocito comienza a dañarse. Sin embargo, a un valor de pH_e = 6.5 la corriente disminuyó únicamente el 20%, observándose a pH_e de 6.12 una rápida disminución en la corriente del 55%, respecto a la corriente máxima registrada a un E = 80mV y pH_e = 7.5. Un residuo de histidina (H98), localizado dentro de la secuencia del filtro de selectividad al ión K⁺ (TIGYG<u>H</u>), presente en la secuencia del canal iónico TASK-3 clonado, confiere la sensibilidad al pH_e (Kim *et al.*, 2000; Rajan *et al.*, 2000). Es posible que la histidina se protone causando un cambio en la interacción entre ésta y los aminoácidos en la región externa del poro, regulando la maquinaria de apertura lo cual afecta la conductancia y la frecuencia de apertura en el canal (Kim, 2005).

Finalmente, el empleo de Ba^{2+} y rojo de rutenio (oxicloro de rutenio amoniacal) como bloqueadores de TASK-3 confirmaron la identidad del canal. Se ha reportado que a una concentración externa de bario de 3mM disminuye la corriente ~57% (Kim *et al.*, 2000), estos iones pueden moverse parcialmente dentro del canal (pero no pueden penetrar) e interactúa con otros iones cercanos al poro, bloqueando la entrada de K⁺ al filtro de selectividad (Grigorcz y Schwarz, 1985). El rojo de rutenio a 10µM bloquea las corrientes de TASK-3 (70%), uniéndose a un residuo de glutamato (E70) en las dos subunidades α que forman el poro (Czirják y Enyedi, 2002a y b). Nuestros resultados mostraron una disminución en las corrientes de ~44% con $[Ba^{2+}]_e$ y ~64% con $[RR]_e$, trabajando a las concentraciones reportadas. El bario y el rojo de rutenio no son inhibidores específicos de TASK-3, ya que inhiben a otros canales, siendo inadecuados para el estudio de TASK-3 en sistemas vivos (Czirják y Enyedi, 2002b, c; Kim, 2005), es por ello la importancia de buscar bloqueadores o activadores específicos del canal TASK-3 que nos permitan obtener una mejor comprensión del funcionamiento de este tipo de canales en células y/o tejidos.

Durante el estudio de caracterización de TASK-3 se observó que su actividad disminuía espontáneamente con el tiempo, este fenómeno llamado "lavado de corriente", es una característica común mostrada por un número de canales iónicos, incluyendo ciertos tipos de canales de Na⁺, K⁺, Cl⁻ y receptores de GABA_A y NMDA (Zhen *et al.*, 2006). La

Discusión

actividad del canal desaparece cuando la membrana es perturbada y excitada o la célula es dializada internamente, causando en algunos casos cambios en el comportamiento de apertura de algunos canales iónicos; la pérdida de factores citoplasmáticos, cambios de desfosforilación por proteína cinasa A y proteólisis dependiente de Ca²⁺ son algunos de los mecanismos que ocasionan este comportamiento (Tang y Hoshi, 1999). Este proceso es un fenómeno biológicamente interesante porque ilustra la regulación de la actividad del canal por factores intracelulares. Sin embargo, es también experimentalmente inconveniente, ya que interfiere con la recopilación de datos registrados en toda la célula. El fenómeno de lavado de corriente se presentó débilmente en el canal TASK-3 clonado (disminución del 4% de la corriente en 300s), por lo que no se realizó ninguna corrección en la corriente, pero en el estudio del efecto del veneno de alacrán sobre el canal TASK-3 se utilizó un protocolo de pulsos distinto al empleado para la caracterización del mismo.

Los resultados obtenidos tanto en la secuencia del canal de potasio TASK-3 de rata clonado así como su caracterización, tienen un comportamiento similar al canal reportado en la literatura. Sin embargo, en todos los casos analizados existen diferencias, incluso el comportamiento de lavado de corriente no se encuentra reportado, sugiriendo que el canal clonado TASK-3 de rata podría tratarse de una isoforma del canal. Para poder afirmar este resultado tendríamos que realizar algunos experimentos para verificar que efectivamente se trata de una isoforma, o bien, estos cambios son causados por alguna de las alteraciones mutacionales hecha sobre la secuencia del canal TASK-3.

5.3 EFECTO DEL VENENO DE ALACRÁN SOBRE TASK-3

Gran parte del conocimiento sobre los canales iónicos de potasio ha sido elucidado usando péptidos-ligandos específicos aislados del veneno de varios animales ponzoñosos como el alacrán. Estos péptidos son herramientas de gran utilidad molecular que contribuyen a obtener un mejor entendimiento de la biofísica y farmacología de los canales iónicos, abriendo nuevas líneas de investigación. Por lo que parte de este proyecto fue probar fracciones totales y parciales del veneno de dos especies de alacranes que habitan en la República Mexicana: *Centruroides limpidus limpidus, Hadrurus gertschi*, y uno originario de Brasil: *Opisthacanthus cayaporum*, sobre el canal de potasio TASK-3. Sin embargo, ninguna de las 22 fracciones probadas presentó actividad sobre el canal.

Existen alrededor de 100 subtipos de canales de K⁺ (Miller, 2000) y solo se han encontrado un número relativamente pequeño de péptidos que afectan la función de estos canales, actuando principalmente sobre canales de K⁺ activados por voltaje o calcio. Hasta la fecha se han caracterizado toxinas que contienen de 22 a 60 residuos de aminoácidos unidos a través de 2-4 puentes disulfuros (Rodríguez y Possani, 2004) que juegan un papel indirecto en la bioactividad del péptido. En particular, cada mitad de cisteína de la molécula contribuye a la estabilización y rigidez de su estructura (Drakopoulou *et al.*, 1998; Pennington *et al.*, 1999), reduciendo su flexibilidad e incrementando la eficacia del bloqueo al canal iónico. Las toxinas de cadenas cortas de 23 a 42 aa, modifican la función predominantemente de canales de potasio (Possani *et al.*, 1999b; Garcia *et al.*, 1999). Como se mencionó en la introducción, las toxinas se han clasificado dentro de ocho categorías dependiendo de su arreglo estructural, siendo todas activas sobre los canales de K⁺, debido a la gran diversidad que estos presentan.

Algunas características de la estructura primaria, más que el arreglo tridimensional, son determinantes importantes para el grado de reconocimiento y unión a varios tipos de canales de K⁺ (Anderson *et al.*; 1988). El reconocimiento depende de ciertos residuos de aminoácidos localizados en puntos específicos de la toxina, que se unen con gran afinidad al vestíbulo externo del poro del canal y bloquean la conducción iónica mediante una oclusión física sin afectar la cinética (Miller, 1998; Mackinnon y Miller, 1988; Mackinnon y Miller, 1989; Giangiacomo *et al.*, 1992), a través de una reacción bimolecular reversible favorecida por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Stocker y Miller, 1994). Se propone que estos péptidos pueden tener en común algún factor molecular clave como una díada funcional (Possani *et al.*, 1999b; Dauplais *et al.*, 1997) o una agrupación de residuos básicos de aminoácidos (Mouhat *et al.*, 2004b).

La típica díada esta compuesta por un residuo de lisina (K) la cual interactúa con el poro del canal y un residuo de aa aromático (tirosina (Y) o fenilalanina (F)) o alifático (L) altamente conservados (Possani *et al.*, 1999b; Dauplais *et al.*, 1977; Gasparini *et al.*, 1998), separados por una distancia de aproximadamente 7A°. El residuo de K se encuentra atraído hacia el centro de un anillo de grupos carbónílicos compuesto de cuatro residuos de aa

Discusión

(ácido aspartico (D) o ácido glutámico (E)) (Mouhat *et al.*, 2004b; M'Barek *et al.*; 2003; Jouirou *et al.*; 2004b), cada uno pertenece a una de las cuatro subunidades- α que forman a un canal de K⁺ funcional. El residuo crítico aromático o alifático de la díada funcional interacciona, vía fuerzas hidrofóbicas, con un grupo de residuos aromáticos (Y y W), que pertenecen a una única subunidad- α del canal de K⁺. Algunas toxinas exhiben triadas en vez de díadas y pueden adoptar más de una posición simple de acoplamiento sobre el poro del canal (Dauplais *et al.*, 1997).

Se evidenció un anillo de residuos básicos de aa presente en varias toxinas que actúan sobre canales de K⁺ del tipo K_v (por ejemplo Pi1, Pi2 (Mouhat *et al.*, 2004b) y Pi4 (M'Barek *et al.*, 2003), del veneno de alacrán *Pandinus imperator*), que podría jugar un papel fundamental en el reconocimiento e interacción de las moléculas con la región del torrete del canal. Donde cuatro a cinco residuos básicos (arginina (R) o K) pueden estabilizar la interacción con el canal, vía formación de un puente salino, con residuos específicos de aminoácidos (W, I, P) en las cuatro subunidades- α del canal (Xu, *et al.*, 2003), sin descartar la presencia de algunas variaciones en el número de residuos que componen al anillo básico de otras toxinas. Además, se han encontrado otros tipos de interacciones de las toxinas con los canales iónicos: de un modo "similar a apamina" (residuos básicos en la hélice- α) y de toxinas específicas hacia canales ERG, donde la toxina se une por el vestíbulo exterior del canal, tanto al segmento transmembranal cinco (S5) como al seis (S6), sin ocluir físicamente el poro (Pardo *et al.*, 2002; Rodríguez y Possani, 2004).

Como ya se ha mencionado, TASK-3 es un dímero de cuatro segmentos transmembranales y dos dominios formadores del poro (4TM/2P), en contraste con los otros canales de potasio que son tetrámeros y cuya cadena polipeptídica contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un sólo domino formador del poro (6TM/1P), y de los cuales se han determinado toxinas con actividad bloqueadora. Los segmentos S5 y S6 junto con el asa que los une forman la región del poro, la cual esta formada por el torrete, la hélice del poro y el filtro de selectividad, constituyendo los elementos que confieren la selectividad al canal y el sitio receptor de toxinas.

Al comparar la secuencia de aa de la región de los dos poros del canal TASK-3 con otros canales de potasio, que son bloqueados por toxinas (**Figura 5.2**), podemos observar

Discusión

que el canal TASK-3 no presenta la región del torrete (letras rojas), ya que no existe una homología en la secuencia de aa en dicha región. Respecto a la región de la hélice del poro (letras azules) existe muy poca relación en las secuencias de aa, con una identidad de aproximadamente el 30% para ambos poros (análisis de LALIGN). Para las regiones del filtro de selectividad (letras rosas) se observó una identidad del 66.7% para el P1 y del 55.6% para el P2 con respecto a la secuencia del canal Shaker. Se reportó que mutaciones en la región de filtro de selectividad, causa una disminución en el bloqueo de la toxina hacia canales de potasio Kv1 (Gilqui *et al.*, 2005). Posiblemente esta posición es crítica para la unión de la toxina por medio de la díada funcional, donde se localiza principalmente el residuo aromático Y (letras verdes), el cual no se encuentra presente en ninguna de las dos secuencias de los poros de TASK-3. Sin embargo, esta no es la única interacción de las toxinas con los canales de K⁺.

Kv1.1		YFA		EAEEAE SHF	SSIPD	AEWWAV	VSMTT	VGYG) MYP	TVIGG	KIVGSLC-
Shaker		<u>YFA</u>		EAGSENSEF	KSI PD	AFWWAV	VTMT <mark>T</mark>	VGYGI	OMT PN	GVWGK	IVGSLC
KcsA		VLA		ERGAPGAQL	ITYPR	ALWWSV	ETATT	VGYG	KLYP\	/TLWGR	c
TASK-3	(P1)	<u>ALE</u> (38	aa)	SE PHRAGVQ	WKF AG	SEYFAI	TVITT	IGYG	HAAPO	TDAGK	AFCMF
TASK-3	(P2)	SQC		ED	WSFFH	AYYYCE	ITLT <mark>I</mark>	IGFG	DEVAI	JQSKGA	LQRKPFY-

Figura 5.2 Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región del poro de TASK-3 con otros canales de potasio. Se presentan subrayados los últimos y los primeros aa de los segmentos transmembranales que limitan la región del poro. La región del torrete se presenta en letras rojas, la región de la hélice del poro con letras azules, la región del filtro de selectividad se presenta en letras rosas oscuro y en letras verdes un sitio de unión de la toxina por medio de la díada funcional. (Pardo *et al.*, 2002; Gilquin *et al.*, 2005).

Del veneno *Centuroides limpidus limpidus* se conocen seis toxinas que bloquean canales de K⁺, dos de ellas clasificadas como α -KTx que bloquean al canal mediante el mecanismo de la díada funcional y las otras cuatro son γ -KTx, que bloquean canales ERG (Corona, *et al.* 2002; Rodríguez y Possani, 2004). Recientemente se caracterizó la primera toxina del veneno *Hadrurus gertsch*, específica para un canal de potasio dependiente de voltaje: Shaker (Schwartz, *et al.*, 2006). Esta corresponde a una de las fracciones puras (HgVII, **Figura 4.5**), probada sobre el canal de potasio TASK-3. La toxina tiene una secuencia de 36 aa con cuatro puentes disulfuros y de acuerdo a sus características se clasificó como α -KTx (α -KTx 6.14); este tipo de toxinas interaccionan con el canal por residuos de la "díada funcional". Del veneno *Opisthacanthus cayaporum* hasta la fecha no se conoce ninguna toxina que bloquee alguno de los canales iónicos de K⁺. Encontrar un ligando con actividad hacia el canal TASK-3 no será una tarea fácil, pero tampoco imposible. Además, las toxinas han evolucionado con el transcurso del tiempo, por lo que claramente se puede distinguir distintos motivos estructurales presentes en todo el reino animal, mostrando factores convergentes moleculares y homología funcional, lo cual nos da pauta para continuar con nuestro proyecto.

Una alternativa a este proyecto de investigación es diseñar ligandos específicos para este canal, por medio de aproximaciones estructurales basadas en la transferencia de un motivo de aminoácidos de unión, a menudo referidos como sitios clave o probables, dentro del ligando de referencia. Los ligandos deben tener propiedades estéricas y electrostáticas compatibles con la proteína y ser capaces de reproducir la topología funcional de ese motivo, independientemente de su estructura secundaria. La identificación de ligandos se obtiene buscando sistemáticamente en el banco de datos para proteínas (NCBI). Esta aproximación se utilizó para diseñar ligandos capaces de bloquear el canal Kv1.2 (Magis *et al.*, 2006).

6. CONCLUSIONES

El canal TASK-3 de rata se clonó y se obtuvo una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica (98.7%) a la reportada en la literatura.

El canal TASK-3 al ser expresado y caracterizado, en ovocitos de *X. laevis* empleando la técnica de TEVC, se comportó ligeramente diferente al reportado en la literatura, por lo que esos cambios en la secuencia podrían haber alterado su comportamiento electrofisiológico, o bien, podría ser una isoforma del canal.

El canal TASK-3 presentó ligeramente el fenómeno de lavado, donde la corriente no se mantuvo a un valor constante y disminuyó con el tiempo.

Al evaluar las fracciones del veneno de las tres diferentes especies de alacranes: *Centruroides limpidus, Hadrurus gertschi y Opisthacanthus cayaporum* sobre el canal de potasio TASK-3 de rata, no se encontró ningún efecto bloqueador o activador evidente en estas fracciones totales o parciales.

PERSPECTIVAS

1.- Verificar si el canal de potasio TASK-3 de rata clonado es una isoforma del canal.

2.- Probar el veneno de diferentes especies de animales ponzoñosos, con el fin de encontrar fracciones con actividad bloqueadora o activadora sobre el canal TASK-3 de rata.

3.- Purificar la (s) fracción (es) y secuenciar el (los) péptido (s) de interés.

4.- Evaluar el efecto de la (s) toxina (s) heteróloga (s) en:

- a) Canales de potasio TASK-3 de rata, ratón y humano.
- b) Canales de potasio 4TM/2P.
- c) En otras familias de canales de potasio.
- d) En diferentes líneas celulares de cáncer.
- e) En modelos biológicos para determinar si tiene alguna actividad in vivo.

5.- Realizar mutaciones sitio dirigidas en la (s) toxina (s) bloqueadora (s) o activadora (s) del canal TASK-3 para evaluarla (s) electrofisiológicamente para determinar los aminoácidos clave en la unión al canal.

BIBIOGRAFÍA

Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. 4th edition; Garland Science; USA. 631-633.

Anders-Enguix, I.; Calye, A.; Yostos, R.; Schumache, M.A.; Sapanu, P.D.; Dickinson, R.; Maze, M.; Franks, N. (2007). Determinantes of the Anesthtic Sensitive of Two Pore Domain Acid Sensitive Potassium Channels. *J. Biol. Chem.* 282 (29), 20977-20990.

Anderson, C.S.; MacKinnon, R.; Smith, C.; Miller, C. (1998). Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage and ionic strength. *J. Gen. Physiol.* **91**, 317-333.

Barres, B.A.; Chun, L.L.Y.; Corey, D.P. (1990). Ion channels in vertebrate glia. Annu. Rev. Neurosc.. 13, 441-474.

Baumgartner, W.; Islas, L; Sigworth, F. J. (1999). Two-Microelectrode Voltage Clamp of *Xenopus* Oocytes: Voltage Errors and Compensation for Local Current Flow. *Biophysical J.* **77**, 1980-1991.

Berg, A.P; Talley, E.M.; Manger, J.P.; Bayliss, D.A. (2004). Motoneurons Express Heteromeric TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ (TASK) Channels Containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) Subunits. *J. Neuroci.* 24 (30), 6693-6702.

Borther, C.D.; Hughes, F.M. Jr; Cidlowki, J.A. (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 32436-32442.

Carbone, E.; Wanke, E.; Prestipino, G.; Possani, L.D.; Maelicke, A. (1982). Selective blockage of voltagedependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature*. **296**, 90-91.

Champman C.G.; Meadows, H.J.; Godden, R.J.; Campbell, D.A.; Duckworth M.; Kelsell, R.E.; Murdock, P.R.; Randall, A.D.; Rennie, G.I., Gloger I. S. (2000). Cloning, localization and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Molecular Brain Research*. **82**, 74-83.

Chen, X.; Talley, E.M.; Patel, N.; Gomis, A.; McIntire, W.E.; Dong, B.; Viana, F.; Garrison, J.C.; Bayliss, D.A. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein a-subunits. *PNAS*. 103 (9), 3422-3427.

Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; MacDonald, R.J.; Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18, 5294-5299.

Cooper, E. C.; Jan, L.Y. (1999). Ion Channel Genes y Human Neurological Disease: Recent Progress, Prospects and Challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 96, 4759-4766.

Corona, M.; Gurrola, G.B.; Merino, E.; Restano-Cassulini, R.; Valdez-Cruz, N.A.; García, B.; Ramírez-Domínguez, M. E.; Coronas, F.I.V.; Zamudio, F.Z.; Wanke, E.; Possani, L.D. (2002). A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺ channels blocking peptides from scorpions of the genus Centuroides. *FEBS Lett.* **534**, 121-126.

Czirják, G.; Enyedi, P. (2002a). Formation of Functional Heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 Twopore Domain Potassium Channel Subunits. *Molecular Pharmacology*. **63**, 646-652.

Czirják, G.; Enyedi, P. (2002b). TASK-3 Ruthenium Red Inhibits TASK-3 Potassium Channel by Interconnecting Glutamate 70 of the Two Subunits. *J. Biol. Chem.*. 277 (7), 5426-5432.

Czirják, G.; Enyedi, P. (2002c). TASK-3 Dominates the Background Potassium Conductance in Rat Adrenal Glomerulosa Cells. *Molecular Endocrinology*. **16** (3), 621-629.

Dahesa-Davila, M.; Possani, L.D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. Toxicon. 32, 1015-1018.

Dauplais, M.; Lecoq, A., Song, J.; Cotton, J.; Jamin, N.; Gilquin, B.; Roumestand, C.; Vita, C.; de Medeiros, C.L.C.; Rowan, E.G.; Harvey, A.L.; Ménez, A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins –conservation of a dyad of functional residues in potassium channel- blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* **272** (7), 4302-4309.

Drakopoulou, E.; Vizzavona, J.; Neyton, J.; Aniort, V.; Bouet, F.; Virelizier, H.; Ménez, A.; Vita, C. (1998). Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of charyddotoxin and evidence that particular cysteine spacing govern specific disulfure bond formation. *Biochemistry.* **37** (5), 1292-1301.

Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Reyes, R.; Huerteaux, C.; Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K^+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *J. EMBO.* **16**, 5464-5471.

Friederich, P. (2003). Basic Concepts of Ion Channel Physiology and Anaesthetic Drug Effects. *European Journal of Anaesthesiology*. 20, 343-353.

García, M.L.; Hanner, M.; Kaczorowski, J. (1998). Scorpion toxins: tools for studying K⁺ channels. *Toxicon*. **36** (11), 1641-1650.

García, M.L.; Hanner, M.; Knaus, H.G.; Slaughter, R.; Kaczorowski, G.J. (1999). Scorpions toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol.* 274, 624-639.

Gasparini, S.; Danse, J.M.; Lecoq, A.; Pinkasfeld, S.; Zinn-Justin, S.; Young, L.C.; de Maideros, C.C.L.; Rowan, E.G., Harvey, A., Ménez, A. (1998). Delineation of the functional site of α -dendrotoxin- the functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channelblocking toxins. *J. Biol. Chem.* 273 (39), 25393-25403.

Giangiacomo, K.M.; Fremont, V.; Mullmann, T.J.; Hanner, M.; Cox, R.H.; García, M.L. (2000). Interaction of charybdotoxin S10A with single maxi-K channels: Kinetics of blockade depend on the presence of the beta 1 subunit. *Biochemistry*. **39**, 6115-6122.

Giangiacomo, K.M.; Garcia, M.L.; MacManus, O.B. (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the largeconductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **3**1, 6719-6727.

Gilquin, B.; Braud, S.; Eriksson, M.A.L.; Roux, B.; Baily, T.D.; Priest, B.T.; García, M.L.; Ménez, A.; Gasparini, S. (2005). A variable residue in the pore of Kv1channels is critical for de high affinity of blockers from sea anemones and scorpions. *J. Biol. Chem.* 230 (29), 27093-27102.

Gurdon, J. B.; Lane, C. D.; Woodland, H. R.; Mairbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messeger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 233, 177-182.

Grygorcz, K.R.; Schwarz, W. (1985). Ca²⁺-activated K⁺ permeability in human erythrocytes: modulation of single-channel events. *J. Eur Biofhys.* **12**(2), 57-65.

Han, J.H.; Stratowa, C.; Rutter, W.J. (1987). Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry*. 26, 1617-25.

Han, J.; Truell, J.; Gnatenco, C.; Kim, D. (2002). Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **542**, 431-444.

Han, J.; Gnatenco, C.; Sladek, C.D.; Kim, D. (2003). Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Piciol.* **546** (3), 625-639.

Herrera, E. (1996). *Bioquímica. Biología Molecular y Bioquímica Fisiologíca.* 2^{da} Reimpresión; MacGraw-Hill Interamericana; España, Madrid. Vol. II, 1113-1117.

Holt, A.G.; Asako, M.; Duncan, R.K.; Lomax, C.A.; Juiz, J.M.; Altschuler, R.A. (2006). Deafness associated changes in expression of two-pore domain potassium channels in the rat cochlear nucleus. *Hearing Research*. 216-217, 146-153.

Jouirou, B.; Mouhat, S.; Androtti, N.; De Waard, M.; Sabatier, J.M. (2004a). Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon.* **43**, 909-914.

Jourirou, B.; Mosbah, A.; Visan, V.; Grissmer, S.; M'Barek, S.; Fajloun, Z.; Van Rietschoten, J.; Devaux, C.; Rochat, H.; Lippens, G. *et al.* (2004b). Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels. *J. Biochem.* 377, 37-49.

Kang, D.; Han, J.; Talley, E.M.; Bayliss, D.A.; Kim, D. (2003). Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **554** (1), 64-77.

Karschin, C.; Wischmeyer, E.; Preisig-Müller, R.; Rajan, S.; Derst, C.; Grzeschik, K-H.; Daut, J.; Karschin, A. (2001). Expression Patter in Brain of TASK-1, TASK-3, and a Tandem Pore Domain K⁺ Channel Subunit, TASK-5, Associated with the Central Auditory Nervous System. *Molecular and Cellular Neuroscience*. **18**, 632-648.

Ketchum, K.A; Joiner, W.J.; Sellers, A.J; Kazmareck, L.K.; Goldstein, S.A.N (1995). A new family of outward rectifying potassium channels proteins with two pore domains in tandem. *Nature*. **376**, 690-695

Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D. (2000). TASK-3, a New Member of the Tandem Pore K (+) Channel Family. J. *Biological Chemistry*. 275 (13), 9340-9347.

Kim, D.; Gnatenco, C. (2001). TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K⁺ Channel Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **284**, 923-930.

Kim, C.J.; Cho, Y.G.; Jeong, S.W.; Kim, Y.S.; Kim, S.Y.; Nam, S.W.; Lee, S.H.; Yoo, N. J.; Lee, J.Y.; Park,
W.S. (2004). Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS*. 112, 588-594.

Kim, D. (2005). Physiology and Pharmacology of Two-Pore Domain Potassium Channels. *Current Pharmaceutical Design*. 11, 2717-2736.

Krezel, A.M.; Kasibhatla, C.; Hidalgo, P.; Mackinnon, R.; Wagner, G. (1995). Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Science*. **4** (8), 1478-1489.

Lauritzen, I.; Zanzouri, M.; Honore, E.; Duprat, F.; Ehrengruber, M.U.; Lazdunski, M.; et al. (2003) K⁺dependent cerebellar granule neuron apoptosis: Role of TASK leak channels. *J. Biol. Chem.* 278 (34), 32068-32076. Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G.; Barhanin J. (1996a). TWIK, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *J. EMBO.* 5, 1004-1011.

Lesage, F.; Reyes, R.; Fink, M.; Duprat, F.; Gillemare, E.; Lansdunzki, M. (1996b). Dimerization of TWIK K⁺ channel subunits via a disulfide bridge.*J. EMBO* 15, 6400-6407.

Lewis, R.S.; Cahalan, M.D.(1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev. Immunol.*. 13, 623-635.

Lewis, R.S.; García, M.L. (2003). Therapeutic Potencial of Venom Peptides. *Nature Reviews Drugs Discovery*. 2: 790-802.

MacDonald, R.J.; Swift, G.H.; Przybyla, A.E.; Chirgwin, J.M. (1987). Methods Enzymol. Berger, S. y Kimmel, A. (eds). Academic Press, Orlando Florida. 152, 219.

MacKinnon, R.; Miller, C. (1988). Mechanismo of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca^{2+} -activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.*. **91**, 335-349.

MacKinnon, R.; Miller, C. (1989). Funtional modification of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by trimethyloxonium. *Biochemistryl.* **28**, 8087-8092.

Magis, C.; Gasparini, D.; Lecoq, A.; Du, M.H.; Stura, E.; Charbonnier, J.B.; Mourier, G.; Boulain, J.C.; Pardo, L.; Caruana, A.; Joly, A.; Lefranc, M.; Masella, M. (2006). Structure-Based Secondary Structure-Independent Approach To Desig Protein Ligands: Application to the Design of Kv1.2 Potassium Channel Blockers. *JACS*. **128**, 16190-16205.

Martin, B.M.; Ramirez, A.N.; Gurrola, G.B.; Nobile, M.; Prestipino, G. (1994). Novel K⁺-Channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. J. Biochem. **304**, 51-56.

M'Barek, S.; Mosbath, A.; Sandoz, G., Fajloun, Z.; Olamendi-Portugal, T.; Rochat, H.; Sampieri, F.; Guijarro, J.I.; Mansuelle, P.; Delepierre, M., et al. (2003). Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. *Eur J. Biochem.* 270, 3583-3592.

Meadows, H.J.; Randall, A.D. (2001). Funtional characterization of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium cannel. *Neuropharmacology.* **40**, 551-559.

Miller, C. (2000). Ion Channels: doing hard chemistry with hard ions. Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 148-151.

Miller, C.; Moczydlowdki, E.; Latorre, R.; Phillips, M. (1985). Carybdotoxin, a protein inhibidor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. **313**, 316-318.

Miller, C. (1995). The Charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron*. 15, 5-10.

Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. Genome Biol. 1 reviews 0004.

Miller, C. (1998). Competition for block of a Ca^{2+} -activated K+ channel by charybdotoxin and tetraethylammonium. *Neuron.* 1, 1003-1006.

Minor, D. L. Jr. (2001). Potassium Channels: Life in the Post-Structural World. *Current Opinion in Structural Biology*. 11, 408-414.

Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard M.; Sabatier, J.M. (2004a). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *J. Biochem.* **378**, 717-726.

Mouhat, S.; Mosbah, A.; Visan, V.; Wulff, H.; Delepierre, M.; Darbon, H.; Grissmer, S., De Waard, M.; Sabatier, J.M. (2004b). The `Functional' dyad of scorpion Pi1 is not by itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *J.Biochem.*. 377 (1), 25-36.

Mu, D.; Chen, L.; Zhang, X.; See, L.H.; Koch, C.M.; Yen C. et al. (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell.* **3**, 297-302.

Müller, C. M. (1992). Intracelular microelectrodes. In: Gatyn R, Kettenmann H (eds.): Practical electrophysiological methods: A guide for in mitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed. New York, USA., 3-5.

Mullis, K.; Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. **155**, 335-50.

Myers, P.; Stampe, P. (2000). A point mutation in the maxi-K clone *dSlo* forms a high affinity site for charybdotoxin. *Neuropharmcology*. **39**, 11-20.

O'Kelly, I.; Butler, M.H.; Zilberberg, N.; Goldstein, S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell.* **111**, 577-588.

Palmer, M.J.; Hull, C.; Vigh, J.; Von Gersdorff, H. (2003). Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J. Neurosci.* 23, 11332-11341.

Pardo-López, L.; Zhang, M.; Liu, J.; Jiang, M., Possani, L.D.; Tseng, G.N. (2002). Mapping the binding site of a HERG-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. *J. Biol. Chem.* 277, 16403-16411.

Patel, A.J.; Honore, E.; Lesage, F.; Fink M.; Romey, G.; Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci.* **2**, 422-426.

Patel, A.J.; Honoré, E. (2001a). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* **24** (6), 339-346.

Patel, A.J.; Honoré, E. (2001b). Anesthetic-sensitive 2P Domain K⁺ Channels. Anesthesiology. 95, 1013-1021.

Patel, A.J.; Lazdunski, M. (2004). The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *J.Physiol.*448, 261-273.

Pei, L. Wiser, O.; Slavin, A.; Mu, D.; Powers, S.; Jan, L.Y.; Hoey, T. (2003). Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 7803-7807.

Pennigton, M, W.; Lanigan, M. D.; Kalman, K.; Mahnir, V. M.; Rauer, H.; Mc Vaugh, C. T.; Behm, D.; Donaldson, D.; Chandy, K. G.; Kem, W. R.; Norton, R. S. (1999). Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin. *Biochemistry*. **38** (44), 1459-1458.

Possani, L.D. (1984). Structure of scorpion toxins. In: Tu, A.T. (Ed.). *Handbook of Natural Toxins*, vol. 12. Marcel Dekker, New York.

Possani, L.D.; Becerril, B.; Delepierre, M.; Tytgat, J. (1999a). Scorpions toxins specific for Na-channels. *Eur. J. Biochem.* **364**, 287-300.

Possani, L.D.; Martin, B.; Svendsen, I. (1982). The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg *Res. Commun.* **47**, 285-289.

Possani, L. D.; Selisko, B.; Gurrola, G.B. (1999b) Structure and function of scorpions toxins affecting K⁺ channels. In: Darbon, H.; Sabatier, J. M.; (Eds.), Prespectives in Drugs Discovery and Design: Animal Toxins and Potassium Channels, **15/16**. *Kluwer/Escom.*, Dordrecht. 15-40.

Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Liu, G.X.; Preisig-Muller, R.; Daut, J.; Karschin, A.; Derst, C. (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J. Biological Chemistry*. Vol 275, No. 22, 16650-16657.

Rajan, S.; Preisig-Muller, R.; Wischmeyer, E.; Nehring, R.; Hanley, P.J.; renigunta, V.; Musset, B.; Schlichthörl, G.; Derst C.; Karschin, A.; Daut, J. (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiology*. **545** (1), 13-26.

Rauer, H.; Lanigan, M.D.; Pennington, M.W.; Aiyar, J., Ghanshani, S., Cahalan, M. D., Norton, R.S.; Chandy, K.G. (2000). Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J. Biol. Chem.* 275, 1201-1208.

Rodríguez, P.; Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon*. 43, 865-875.

Rudy, B. (1998). Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neurosciences*. 25, 729-749.

Sambrook, J.; Fritsh, E.F.; Maniatis, T.(1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manuals. Vols. I, II, III. (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schwartz, E.F.; Schwartz, C.A.; Gómez-Lagunas, F.; Zamudio, F.Z.; Possani, L.D. (2006). HgeTx1, the first K+-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion Hadrurus gertschi Soleglad. *Toxicon*. 48, 1046-1053.

Stampe, P.; Kolmakova-Partensky, L.; Miller, C. (1994). Intimations of K⁺ channels structure from a complete functional map of the molecular surface of charydbotoxin . *Biochemistry*. **33** (22), 443-450.

Stocker, M.; Miller, C. (1994). Electrostatic distance geometry in a K^+ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry.* **33**, 443-450.

Stühmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. In: Rudy B., Iverson L. E.: Ion channels. Methods Enzymology. 207, 319-338.

Stühmer, W. (1998). Electrophysiological recording form *Xenopus* oocytes. In: Conn MP (ed.): Ion channels. Part B. Methods Enzymology. **293**, 280-300.

Stühmer, W.; Parekh, A. B. (1995). Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In Single- Channel Recording. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press, New York, USA. 341-356.

Swartz, K.J. (2004). Towards a structural view of gating in potassium channels. Nature Reviews. 5, 905-916.

Talley, E.M.; Solórzano, G.; Lei, Q.; Kim, D.; Bayliss, D.A. (2001). CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channel Family. *J. Neuroci.* 21 (19), 7491-7505. **Talley, E.M.; Bayliss, D.A. (2002).** Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* **277**, 17733-17742.

Talley, E.M.; Sirois, J.E.; Lei Q.; Bayliss, D.A. (2003). Two-pore-domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist*. 9 (1), 46-56.

Tang, X.D.; Hoshi, T. (1999). Rundown of the Hyperpolarization-Activated KAT1 Channel Involves Slowing of the Opening Transitions Regulated by Phosphorylation. *J. Biophisical.* **76**, 3089-3098.

Thompson, J.; Begenisich, T. (2000). Electrostatic interaction between charybdotoxin and a tetrameric mutant of Shaker K(+) channels. *J. Biophys.* **78**, 2382-2391.

Tytgat, J.; Chandy, K.G., García, L.M.; Gutman, G.A.; Martin-Euclaire, M.F.; Van del Walt, J.J.; Possani, L.D. (1999). A unified nomenclature for short chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20, 445-447.

Wagner, C. A.; Friedrich B.; Setiawan I.; Lang F.; Bröer S.; (2000). The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins. *Cellurar Physiol Biochem*, **10**, 1-12.

Watkins, C.S.; Mathie, A. (1996). A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **491**, 401-412.

Wei, A; Jegla, T.; Salkoff, L. (1996). Eight potassium families revealed by the C. elegans genome project. *Neuropharmacology*. **35** (7), 805-829.

Vazquez, J.; Feigenbaum, P.; King, V.F.; Kaczorowski, G.J.; García, M.L. (1990). Characterization of high affinity binding sites for charydbotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain: evidence for a direct association with an inactivating, voltage-dependent, potassium channel. *J. Biol. Chem*, **256**, 15564-15571.

Yu, S.P. (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. Prog Neurobiol. 70, 363-386.

Xu, C.Q; Zhu, S.Y.; Chi, C.W.; Tytgat, J. (2003). Turret and pore block of K⁺ channels: What is the difference?. *TREND in Pharmacological Sciences*. 24 (9), 446-448.

Zerrouk, H.; Mansuelle, P.; Benslimane, A.; Rochat, H.; Martin-Eauclaire, M.F. (1993). FEBES Lett. 320, 189-292

Zhen X-G.; Yamada, Y; Zhang Y.; Doyle C.; Yang J. (2006). A single amino acid mutation attenuates rundown of voltage-gated calcium channels. *FEBS lett.* **580** (24), 5733-5738.

Zlotkin, E.; Miranda, F.; Rochat, H. (1978). Chemisty and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Bettini, S. (Ed.). *Handbook for Experimental Physiology*. Springer, Heidlberg,. **48**, 317-369.

APÉNDICE

Preparación de medios:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL (M)	CANTIDAD (mg) PARA UN 1L
KCl^1	0.0027	200
$K_2 HPO_4^{-1}$	0.001	200
NaCl ¹	0.13	8 000
$Na_2HPO_4^2$	0.008	1 143.63

Medio salino de fosfato Dubelco (DPBS)

 $pH = 7.4 \text{ con } HCl^1 \text{ diluido.}$

Medio SOC

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/mL)
Bacto-triptona	0.21
Extracto de bacto-levadura	0.005
NaCl	5.263×10^{-4}
Glucosa	3.6

 $pH = 7.0 \text{ con NaOH}^2 5N$

Medio Luria- Bertani (LB)

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/mL)
Bacto-triptona ³	0.01
Extracto de bacto-levadura ³	0.005
NaCl	0.01
Agar ³	0.015 (sólido)

pH = 7.0 con NaOH 5N

Amortiguadores para el miniprep y maxiprep:

¹ J.J. Baker (R.A.) ² Sigma (R.A) ³ DIFCO

Amortiguador P1

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (M)	CANTIDAD POR 1L
Tris base	0.05	6.06g
EDTA.2H ₂ O	0.011	3.72g
RNAsa A	1.45×10^{-5}	100mg

pH = 8.0 con HCl diluido

	Amortiguador P2		
COMPUESTO	CANTIDAD POR 1 L		
NaOH	8g (0.02M)		
SDS	50mL (al 20%)		

Amortiguador P3

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (M)	CANTIDAD (g) POR 1L
KCH ₃ COO	3.0	294.5

pH = 5.5 con ácido acético glacial (~110mL)

Amortiguador QBT

COMPUESTO	CANTIDAD POR 1L
NaCl	43.83g (0.75M)
MOPS (libre de ácido)	10.46g (0.05M)
Isopropanol	150mL (1.97M)
Triton X-100	15mL (10%)

Amortiguador QC

COMPUESTO	CONCENTRACION	CANTIDAD POR	
	(M)	1L	
NaCl	1.0	58.44g	
MOPS (libre de	0.05	10.46g	
ácido)			
Isopropanol	1.97	150mL	

pH = 7.0

Amortiguador QF

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD POR	
	(M)	1L	

NaCl	1.25	73.05g
Tris base	0.05	6.06g
Isopropanol	1.97	150mL

Medios para Electrofisiología:

ND-96

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD POR
	FINAL (mM)	1L (g)
NaCl	100	5.845
KCl^4	2	1.149
$CaCl_2^5$	1.8	0.2646
MgCl ₂ ⁵	1	0.2033
HEPES ⁵	5	1.191

pH = 5.66, 6.12, 6.50, 7.00, 7.40, 7.50 y 8.00 con NaOH 1M.

Con Gentamicina 50µg/mL

RO-2 "libre de calcio"

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD PARA
	FINAL (mM)	1L (g)
NaCl	82.5	4.82
KCl	2	0.149
MgCl ₂	1	0.203
HEPES	5	1.1191

pH = 7.0 con NaOH 1M

⁴ Sigma (R.A.) ⁵ J.J. Baker (R.A.)