



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**MUTACIONES PUNTUALES EN EL AMINO
TERMINAL DEL CANAL DE POTASIO GIRK5,
DETERMINAN SU EXPRESIÓN FUNCIONAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
CLAUDIA IVETH RANGEL GARCIA**



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO
VOCAL: Dr. JOSE DE JESUS GARCIA VALDES
SECRETARIO: Dra. LEONILA IRMA ESCOBAR PEREZ
1er. SUPLENTE: Dr. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
2do. SUPLENTE: Dr. JOSE ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS

El trabajo presentado se realizó en el Edificio A de Investigación,
Laboratorio 510, Departamento de Fisiología de la Facultad de
Medicina de la U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. LAURA ESCOBAR PÉREZ.

SUSTENTANTE:

CLAUDIA IVETH RANGEL GARCÍA

El apoyo financiero para la realización del trabajo experimental corrió a cargo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de la DGAPA.

Proyecto No. IN224406

DEDICATORIA

*En especial quiero dedicar esta Tesis a mis padres “**Gloria García y José Luis Rangel**” por su “gran amor, apoyo y sobre todo la paciencia” que me han brindado durante todo este largo recorrido.*

*A mis queridos hermanos “**Dulce, José Luis y Monserrat**” porque siempre están a mi lado.*

*A mis amados sobrinos: **Fernando, Carolina y Jennifer** por quererme tanto.*

*A mi tío **Agustín García Bautista** (†) porque donde quiera que esté, siempre cuento con su apoyo.*

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Laura Escobar Pérez** por su orientación en la realización de esta tesis y principalmente por no dejarme caer y por hacerme pensar que todo en esta vida vale la pena.

Al jurado **Dr. Ignacio Camacho Arroyo** y **Dr. José De Jesús García Valdés** por sus valiosas observaciones a esta tesis.

A la **M. en C. Carolina Salvador Hernández** por su apoyo y su aportación en la realización de esta tesis.

A mis amigas y compañeras de laboratorio: **Zinaeli, Liliana** y **Beatriz** por su asesoría y por compartir conmigo su conocimiento.

A todos mis familiares por creer en mi: Familia **García Bautista** y Familia **Rangel Huerta**

A mis amigos “**Patricia, Belen, Fanny, Betzabé, Antonio, Nayeli** y **Cintia** por apoyarme durante todo este tiempo de conocernos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme realizar mis estudios de Bachillerato y Licenciatura en sus instalaciones.

Al **Facultad de Medicina** por la oportunidad que me ofreció para la realización de esta Tesis.

Al **PAPIIT (IN224406)** por la beca otorgada.

*Soñemos, quizá entonces hallaremos la verdad...
pero abstengámonos de publicar nuestros sueños antes
de haberlos puesto a prueba con la mente despierta.*

Friedrich August Kekulé (1829-1896)

*...las vendas cayeron de mis ojos, las dudas se
desvanecieron y una sensación de tranquila
certidumbre ocupó su lugar.*

Luthar Meyer (1830-1895)

Índice General

Capítulo.....	Pág.
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Canales iónicos.....	3
3.1. Canales de potasio.....	4
3.2. Clasificación de los canales de potasio con base en su topología.....	4
3.2.1. Canales de potasio 2TM/P.....	5
3.2.2. Canales de potasio 4TM/2P.....	5
3.2.3. Canales de potasio 6TM/P.....	5
3.2.4. Canales de potasio 8TM/2P.....	5
4. Los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir).....	6
4.1. Estructura de los canales Kir.....	6
4.2. Clasificación de los canales Kir.....	7
4.3. Rectificación entrante.....	7
5-Subfamilia Kir 3 (GIRK).....	9
5.1. Activación por proteínas G heterotriméricas.....	9
5.2. Distribución y función de los canales Kir 3 (GIRK).....	11
6. Electrofisiología.....	13
6.1. Propiedades eléctricas de las membranas biológicas.....	13
6.2. Métodos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos.....	14
7. Expresión en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	16
8. Biología Molecular.....	17
8.1. “Mutagénesis <i>in vitro</i> ”.....	17
9. Tráfico vesicular intracelular.....	18
9.1. Transporte de vesículas.....	18
9.2. Rutas de tráfico para la distribución de las proteínas de membrana.....	19
9.2.1. Ruta biosintética – secretora.....	20
9.2.2. Ruta endocítica.....	20
9.3. Señales de localización de proteínas.....	21
9.3.1. Señales tipo dileucina.....	22
10. El Canal GIRK5.....	23

11. Justificación.....	26
12. Hipótesis.....	26
13. Objetivos.....	27
13.1. Objetivo general.....	27
13.2. Objetivos particulares.....	27
14. Metodología.....	28
14.1. Biología Molecular.....	28
14.1.2. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR.....	28
14.2. Obtención y manejo de los ovocitos.....	31
14.3. Microinyección.....	31
14.4. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.....	31
14.5. Análisis estadístico.....	32
15. Resultados	33
15.1. Expresión de los canales en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	33
15.2. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.....	34
15.2.1. Relación corriente – tiempo (I-t).....	35
15.2.2. Relación corriente – voltaje (I -V).....	35
15.2.3. Rectificación de los canales GIRK5.....	37
15.3. La mutación del residuo de serina 18 de la secuencia <u>ESPQLI</u> promueve la expresión funcional del canal GIRK5.....	38
16. Discusión.....	42
16.1. Análisis estadístico.....	42
16.1.2. Prueba <i>t</i> de student.....	43
16.1.2.1. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5S18A.....	45
16.1.2.2. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5P19A.....	46
16.1.2.3. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5Q20A.....	48
16.2. Posible función del residuo de serina S18 de la secuencia <u>ESPQLI</u> en el canal GIRK5.....	49
17. Conclusiones.....	55
18. Perspectivas.....	55
19. Literatura citada.....	56

1. Resumen

Los canales de potasio (K^+) rectificadores entrantes (Kir) tienen un papel importante en el control del potencial de membrana en reposo, en la regulación de la excitabilidad celular y la secreción de hormonas como la insulina. El papel fisiológico de los canales Kir proviene de su “rectificación”, es decir, su insignificante conductancia saliente a valores de potencial de membrana mayores del potencial de equilibrio del K^+ (E_K), lo cual fija el potencial de membrana en reposo cerca del E_K . La variación en el nivel de esta conductancia cambia el potencial de reposo y altera la excitabilidad de la célula.

La familia de los Kir comprende siete subfamilias (Kir1-Kir7). Los canales de la subfamilia Kir3 también conocidos como GIRK, se caracterizan por ser activados por el dímero $G\beta\gamma$ a través de los receptores acoplados a las proteínas Gi/Go. Existen cinco miembros de esta subfamilia GIRK (GIRK1-5). Los GIRK de mamífero forman heteromultímeros con el GIRK1 y se distribuyen principalmente en el corazón (GIRK1/GIRK4) y el cerebro (GIRK1/GIRK2, GIRK1/GIRK3 y GIRK1/GIRK4). El canal de potasio GIRK5 es un canal endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. El canal GIRK5 endógeno puede registrarse en soluciones con alto K^+ a voltajes hiperpolarizantes y es de magnitud variable (0.1 hasta cerca de 2 μA) dependiendo del lote de ovocitos. GIRK5 presenta una región amino terminal más larga por 25 aminoácidos en comparación con sus homólogos de mamífero y forma homomultímeros funcionales. En nuestro laboratorio se demostró que la fosforilación del canal GIRK5 regula su tráfico a la membrana plasmática. Se identificó un residuo de tirosina en la región amino terminal (Y16) del canal, que al fosforilarse por una c-Src endógena mantiene al canal endocitado (Mora y Escobar, 2005). No hay en la literatura casos de proteínas de membrana que se queden retenidas por la fosforilación de una tirosina. Sin embargo, observamos que la Y16 está adyacente a un motivo de endocitosis o internalización del tipo dileucina modificado YEXXXLI. Hasta la fecha no se ha reportado que estos motivos estén acotados por residuos de tirosina fosforilables.

El objetivo de este trabajo es determinar si la secuencia ESPQLI es un motivo de internalización. La estrategia experimental consistió en mutar uno a uno los residuos de serina (S18), prolina (P19) y glutamina (Q20) por alanina (A), lo que resultó en los canales mutantes: GIRK5S18A, GIRK5P19A y GIRK5Q20A. El estudio de la expresión funcional de los canales GIRK5 recombinantes se llevó a cabo en los ovocitos por la técnica de

fijación del voltaje con dos microelectrodos (voltage-clamp). Se utilizó el programa Origin para el análisis de las corrientes. Se esperaba que los canales mutantes de GIRK5 no fueran funcionales. Sin embargo, el canal GIRK5S18A sí es funcional. Para explicar este resultado se reconoció que la S se encuentra acotada por los residuos: KKRLYESPQ dentro de las secuencias consenso de fosforilación por PKT, PKA y PKG: I/L-Y-D/E-X-L, R/KXXXS y KRXXS, respectivamente. Por consiguiente, los resultados sugieren que la fosforilación de la tirosina Y16 y/o la serina S18 por cinasas endógenas, regulan el tráfico del canal GIRK5 a la membrana plasmática.

2. Introducción

Todas las células se encuentran limitadas por una membrana plasmática. A pesar de sus formas y funciones diversas, las biomembranas tienen una estructura de bicapa lipídica con moléculas proteicas embebidas en ella [Muñoz – Martínez y García, 1998; Alberts *et al* 2002]. Sus propiedades como barrera limitante se manifiestan por su permeabilidad selectiva que permite a la célula mantener una diferencia de distribución iónica entre el medio extracelular e intracelular. La composición del medio extracelular posee una alta concentración de iones sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-), y concentraciones muy bajas de iones potasio (K^+), respecto a sus concentraciones intracelulares (**Tabla 1**) lo que resulta en gradientes de concentración y de cargas eléctricas a ambos lados de la membrana. Lo anterior da lugar a un potencial de membrana en el que el interior de la célula es negativo con respecto al exterior. El gradiente de concentración junto con el potencial eléctrico crea un gradiente electroquímico a través de la membrana para cada especie iónica. [Pocock, *et al.* 2005; Aidley y Stanfield, 1998].

Tabla 1. Distribución celular de los iones en los mamíferos.

Ión	Medio intracelular (mM)	Medio extracelular (mM)	Potencial de Equilibrio ^a
Na^+	12	145	+67
K^+	155	4	-98
Ca^{2+}	0.1	1.5	+129
Cl^-	4.2 ^b	123	-90

Tomado de Hille, 2001

3. Canales iónicos

La membrana plasmática no es permeable a moléculas polares y a iones pero pueden fluir por proteínas de membrana, como lo son las bombas, los transportadores y los canales iónicos; estos últimos facilitan el paso de los iones a través de la membrana a una velocidad 10^5 veces superior a la de cualquier transportador [Alberts, *et al.* 2002]. El transporte mediado por los canales iónicos es siempre pasivo por lo que los iones pueden difundir rápidamente a favor de los gradientes electroquímicos a través de la bicapa lipídica [Hille, 2001; Aidley y Stanfield, 1998]. Los canales iónicos no solo se restringen a las membranas de las células excitables eléctricamente, están presentes en todas las células animales y se encuentran en plantas y microorganismos, también se encuentran en las membranas intracelulares de los orgánulos [Alberts, *et al.* 2002].

Los canales iónicos poseen varias propiedades que los hacen muy efectivos en el control de la permeabilidad de los iones:

- 1.- Tienen un poro acuoso central que puede abrirse por cambios conformacionales para dejar pasar hasta 100 millones de iones por segundo de un lado al otro de la membrana [Aidley y Stanfield, 1998].
- 2.- Presentan selectividad, los canales permiten el paso de ciertos tipos de iones, con exclusión de otros. Este mecanismo está basado en una combinación de tamaño y carga del ion.
- 3.- Varían considerablemente en su mecanismo de compuerta “*gating*” responsable de su apertura y cierre. La apertura de los canales iónicos resulta de los cambios conformacionales del canal que pueden ser iniciados en respuesta a cambios en el voltaje a través de la membrana (canales dependientes de voltaje), por la unión a un ligando como neurotransmisores y hormonas o por segundos mensajeros citoplasmáticos (canales dependientes de ligando) o por estrés mecánico (canales regulados mecánicamente) [Molleman, 2002; Alberts, *et al.* 2002; Aidley y Stanfield, 1998].

Los canales iónicos además de tener el control del flujo iónico en las células, han asumido papeles fundamentales en la función de los organismos; en los procariotes son cruciales para la supervivencia y el crecimiento celular. En organismos superiores, los canales iónicos son componentes de la señalización intracelular particularmente en las neuronas [Choe, 2002].

3.1. Canales de potasio

Los canales iónicos más comunes son los que permiten el paso de iones K^+ . Estos canales se encuentran en muchos tipos de células y contribuyen a una amplia variedad de procesos fisiológicos como el flujo de iones, el volumen celular, la liberación de hormonas y transmisores y la excitabilidad neuronal. El K^+ es el catión cuya concentración es más abundante en el medio intracelular respecto al extracelular (**Tabla 1**) y establece el potencial de membrana en el reposo.

El potencial de membrana de la mayoría de las células es muy cercano al potencial de equilibrio para el K^+ debido a que sus membranas en el reposo son selectivamente permeables al K^+ [Bolsover, *et al.* 2004].

Los canales de potasio se encuentran compuestos de subunidades α y, en algunos casos, se acompañan de subunidades β . Un canal de potasio prototipo consiste de cuatro subunidades que están agrupadas para formar el poro (**P, Esquema 1**). En el poro hay una secuencia de residuos de aminoácidos altamente conservada (TVGYG) que se denomina el filtro de selectividad, estos residuos favorecen el paso de los iones K^+ sobre los del Na^+ . En el filtro de selectividad los iones K^+ se distribuyen en cuatro sitios de unión referidos del 1 al 4 [Doyle, *et al.* 1998; Mackinnon, 2003].

3.2. Clasificación de los canales de K^+ con base en su topología.

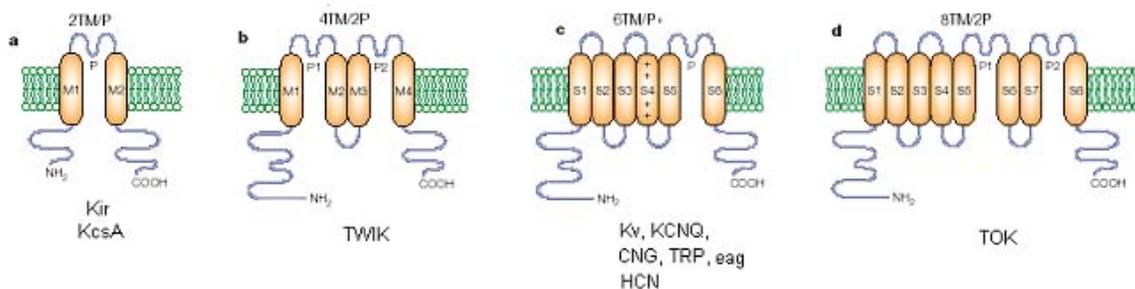
Existe una gran variedad de canales de K^+ que se diferencian por sus propiedades farmacológicas y topológicas. Con base en su topología se clasifican como canales de K^+ con dos, cuatro, seis y ocho segmentos transmembranales (**Esquema 1**).

3.2.1. Canales de K⁺ 2TM/P

Consisten de dos segmentos transmembranales (M1 y M2) con la región del poro (P) entre ellos (**Esquema 1a**); los canales de K⁺ rectificadores entrantes (Kir) y el canal de K⁺ bacteriano KcsA, son ejemplo de estos [Choe, 2002; Bichet, *et al.* 2003]. Las características de esta familia se describen en el capítulo siguiente.

3.2.2. Canales de K⁺ 4TM/2P

Canales con cuatro segmentos transmembranales y dos regiones del poro (P). Estos canales se han nombrado KCNK, también se les ha denominado canales TASK, TREK, TRAAK, TWIK (**Esquema 1b**) y se les conoce como canales de fuga. Se ha sugerido que estos canales se agregan en dímeros para formar un poro funcional [Biggin, *et al.* 2000].



Esquema 1. Topología de los canales de potasio. Se muestra las cuatro principales clases de canales de potasio respecto al número de segmentos transmembranales TM, las regiones del poro (P) que presentan y la familia a la que pertenecen. [Modificada de Choe, 2002]

3.2.3. Canales de K⁺ 6TM/P

Canales que presentan seis segmentos transmembranales y una región P (**Esquema 1c**) incluyen a la familia de los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv), los KCN, los HCN, los eag, los TRP y los canales de K⁺ activados por calcio de baja y mediana conductancia (K_{Ca2+}) [Aidley y Stanfield, 1998; Hille, 2001].

3.2.4. Canales de K⁺ 8TM/2P

Canales con ocho segmentos transmembranales y dos dominios del poro (P). Estos canales se han identificado únicamente en las levaduras (**Esquema 1e**; Choe, 2002).

4. Los canales de K⁺ rectificadores entrantes (Kir).

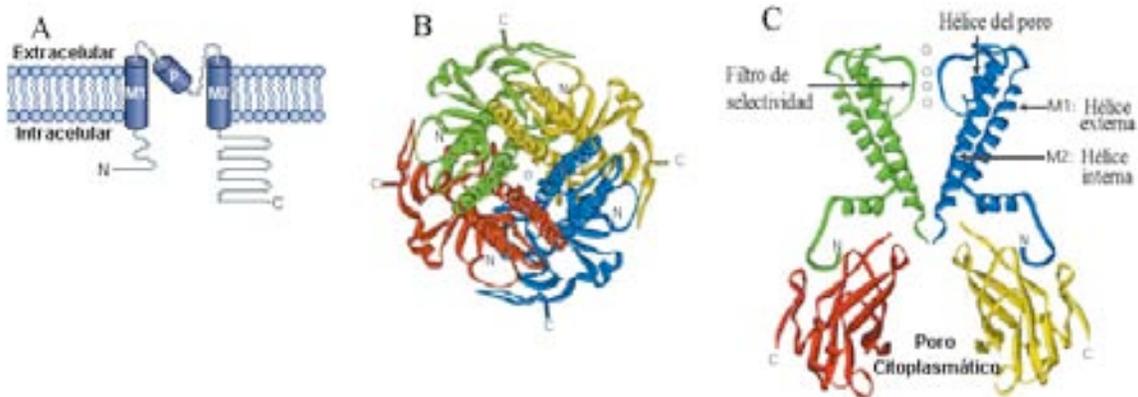
Los canales tipo Kir fueron descritos por primera vez por Bernard Katz (1949) en el músculo esquelético de la rana. Debido a que el tipo de rectificación que se conocía hasta entonces era la de los canales de K⁺ rectificadores tardíos Kv, a los canales Kir se les denominó rectificadores anómalos [Hille, 2001]. Esta corriente anómala o de rectificación entrante predomina a voltajes por debajo del potencial de reposo y declina con la despolarización de la membrana. La rectificación entrante se refiere a la habilidad de un canal iónico para permitir mayor entrada que salida de iones. [Bichet, *et al.* 2003].

El papel fisiológico de los canales Kir es el de mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ión K⁺ (E_K). En consecuencia, regulan la excitabilidad celular, la secreción de insulina, el tono vascular y mantienen el balance electrolítico [Bichet, *et al.* 2003; Lu, 2004].

Algunos de estos canales pueden ser modulados en forma indirecta por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos celulares [Hille, 2001]. También son regulados por elementos intracelulares y membranales como son los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, el ATP, las cinasas, el pH y las proteínas G heterotriméricas, entre otros [Bichet, *et al.* 2003; Ruppertsberg, 2000].

4.1. Estructura de los canales Kir.

Las estructuras cristalinas de KirBac y KcsA nos dan una representación de la estructura de los canales Kir de eucariontes. Los canales Kir se agregan en tetrámeros para formar un canal funcional (**Esquema 2 B y C**) [Bichet, *et al.* 2003]. Cada subunidad alfa se encuentra formada por dos hélices transmembranales (M1 y M2). Entre los segmentos M1 (hélice externa) y M2 (hélice interna) se encuentra la región que forma el poro (**Esquema 2A**) [Ho, *et al.* 1993; Kubo. *et al.* 1993].



Esquema 2. Topología de los canales Kir . A) Representación esquemática de una subunidad α . Cada subunidad comprende dos segmentos transmembranales (M1 y M2), una región del poro (P) y tanto el amino (N) como el carboxilo (C) terminal son citoplasmáticos. **B) Vista extracelular del tetrámero de un canal bacteriano KirBac1.1** donde se observa el poro. **C) Muestra el arreglo de los dominios transmembranales de dos subunidades α del canal KirBac1.1.** Las esferas representan los iones K^+ en el filtro de selectividad. [Modificado de Bichet, *et al.* 2003]

4.2. Clasificación de los canales Kir.

En 1993 el grupo de Ho y de Kubo reportaron la clonación de los primeros canales Kir. Doupnik y colaboradores (1995) agruparon a los canales Kir en varias subfamilias con base en la homología de su secuencia de aminoácidos y sus propiedades. Hasta la fecha se han identificado siete subfamilias (Kir1 - Kir7). Las características de cada subfamilia se describen en la **Tabla 2**.

4.3. Rectificación entrante.

La corriente entrante inducida a voltajes hiperpolarizantes respecto al E_K es de mayor magnitud comparada con la corriente saliente producida a voltajes despolarizantes, aun cuando las concentraciones de K^+ sean iguales en ambos lados de la membrana [Nichols y Lopatin, 1997; Lu, 2004]. Esta propiedad de rectificación se debe principalmente al bloqueo interno dependiente del voltaje por el ión Mg^{2+} y por poliaminas citosólicas como la espermina y espermidina [Matsuda, *et al.* 1987; Lopatin, *et al.* 1994; Bianchi, *et al.* 1996; Lu, 2004]. Parte de esta rectificación parece ser intrínseca y ocurre en menos de 1 ms [Hille, 2001]. Entre miembros de la familia Kir, hay rectificadores fuertes (Kir2 y Kir3) y rectificadores débiles (Kir1 y Kir6) (**Esquema 3**). El grado de rectificación está relacionado con la afinidad de los boqueadores al canal.

Tabla 2. Subfamilia de los canales Kir , localización y algunas características importantes.

Subfamilia	Localización	Características
¹ Kir 1.x (ROMK)	- Riñón de rata - Cerebro - Riñón	-Rectificadores débiles -Un sitio de unión a fosfatos en la región del C-terminal -Forman homomultímeros funcionales. -Conductancia unitaria es de 30 pS
² Kir 2x (IRK)	- Corazón - Cerebro - Músculo esquelético	- Rectificadores fuertes - Forman homomultímeros funcionales - Conductancia unitaria varía de 10 a 32 pS
³ Kir 3 (GIRK).	-Corazón -Cerebro -Tejidos endocrinos -Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	-Rectificadores fuertes -Forman heromultímeros funcionales -Activación por proteínas G
⁴ Kir 4	-Cerebro de rata	-Forman homomultímeros funcionales -La conductancia unitaria del homomultímero es de 25.2 pS, -Sensibles al pH intracelular.
⁴ Kir 5	-Cerebro de rata -Testículo de rata	-Forma homotetrámeros funcionales (Kir4.1/Kir5.1) -La conductancia unitaria del heterotetrámero es de 59 pS -Sensibles al pH intracelular.
⁵ Kir 6 (KATP).	-Islotes pancreáticos -Corazón -Músculo esquelético	-Asociados a receptores de sulfonilurea (SUR) -Forman homomultímeros funcionales -Conductancia unitaria es de 37.3 pS -Dependientes de ATP
⁶ Kir 7	-Células piramidales -Células de purkinje -Cerebro -Riñón -Estómago -Intestino delgado	-Rectificación débil -La conductancia unitaria 50 fS

1- Ho et al. 1993, Lu y Mackinnon 1994a

2- Kubo et al. 1993, Tang et al. 1995

3- Kubo et al. 1993

4- Bond et al. 1994, Tanemoto et al. 2002.

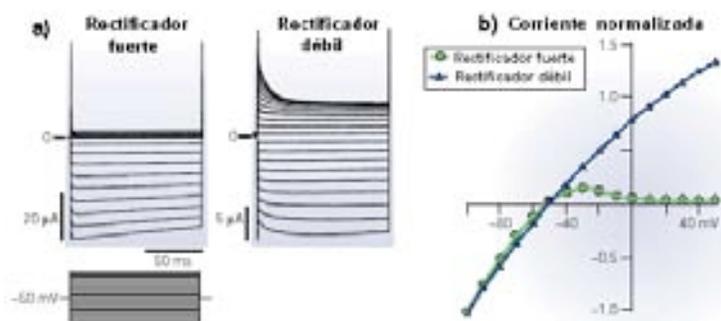
5- Tarasov et al. 2004, Sim et al. 2002

6- Krapivinsky et al. 1998a Partiseti et al. 1998

Estudios de la cinética del bloqueo por Mg^{2+} y espermidina, además del análisis mutacional, indicaron que hay más de un sitio de unión para el bloqueo en los canales Kir. La presencia de un residuo de aspartato (D172 en Kir 2.1), altamente conservado en el dominio M2, es crucial para la rectificación [Bichet, *et al.*2003; Lu, 2004].

Los rectificadores débiles como los Kir1.1 poseen una asparagina (N171), en lugar del aspartato presente en el canal Kir2.1 (D172).

Por otra parte, se identificó que el residuo de serina en el M2 (S165 en Kir2.1) es importante para el bloqueo por el Mg^{2+} pero no para el bloqueo con las poliaminas [Bichet, *et al.* 2003]. El “gating” de los canales Kir depende principalmente de la concentración de K^+ externo y del potencial de membrana (E_m) [Hagiwara y Yoshii, 1979; Matsuda, 1991; Kubo, 1996].



Esquema 3. Rectificación entrante. a) relación corriente–tiempo (I–T) y b) relación corriente–voltaje (I–V) de un rectificador entrante fuerte y uno débil. El protocolo de pulsos consiste en pasos de voltaje de -140 mV a +50 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -50 mV. [Modificada de Bichet, et al. 2003]

5-Subfamilia Kir 3 (GIRK).

La subfamilia Kir3 son activados por una variedad de receptores inhibitorios acoplados a proteínas G heterotriméricas y es por esto que se les denomina canales GIRK (**Esquema 4**) [Zhang, et al. 2002; Neer, 1995, Wettschureck y Offermanns, 2005].

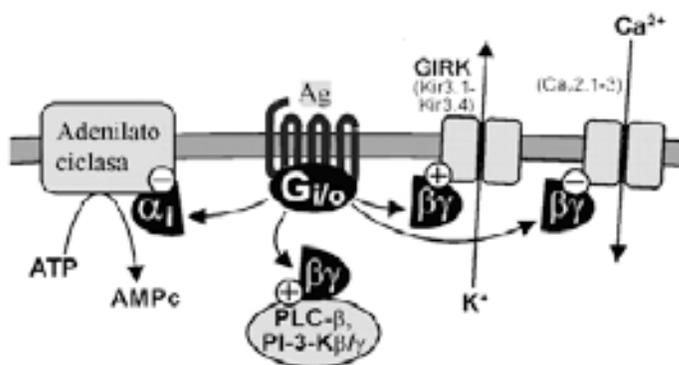
5.1. Activación por proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, la alfa (α), la beta (β) y la gama (γ). Las dos últimas forman un dímero estable ($G\beta\gamma$) que únicamente se disocia cuando se desnaturaliza la proteína. [Neer 1995]. La subunidad $G\alpha$ se tiene sitios de unión para el GDP y el dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor acoplado a las proteínas G es activado, se promueve el intercambio de GDP por GTP y la separación de la subunidad $G\alpha$ GTP tanto del receptor como del dímero $G\beta\gamma$. Las subunidades $G\alpha$ GTP y $G\beta\gamma$ libres modulan la actividad de una amplia variedad de efectores como las enzimas o canales iónicos. La señalización termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ que convierte el GTP en GDP. El trímero se asocia nuevamente y se regresa al estado basal. Las proteínas reguladoras de la señalización mediada por las proteínas G (RGSs o GAPs) incrementan la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$. [Neer 1995, Wettschureck y Offermanns 2005]

La subunidad $G\alpha$ confiere las propiedades básicas de las proteínas G heterotriméricas y se subdividen en cuatro subfamilias $G_{\alpha s}$ (activan a la adenilato ciclasa), $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ (inhiben a la adenilato ciclasa), $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ (Activan a la fosfolipasa C) y $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$ (activan a la fosfolipasa A2) [Wettschureck y Offermanns 2005] Los canales GIRK son activados directamente por el dímero $G\beta\gamma$ que es liberado en la activación de los receptores membranales acoplados a proteínas G del tipo G_i/G_0 (**Esquema 4**) [Bichet, *et al.* 2003; Wettschureck y Offermanns, 2005]. Las proteínas $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ son sensibles a la toxina de Bordetella pertussis, la toxina pertussis, la cual evita que la proteína interactúe con el receptor [Wettschureck y Offermanns 2005].

Se ha demostrado que las subunidades $G\beta 1\gamma 2$ interactúan directamente en diversas regiones con el amino (N) y el carboxilo (C) terminal de los canales GIRK [Huang. *et al.* 1995 y 1997].

Los receptores acoplados a las proteínas G_i/G_0 que activan a los canales GIRK son: el muscarínico m_2 , el adrenérgico α_2 , el dopaminérgico D_2 , el de serotonina ($5HT_{1A}$), el de adenosina A_1 , el de ácido γ -aminobutírico B ($GABA_B$), el de esfingosina 1-fosfato, el de somatostatina y los opioides κ , μ y δ [Werner, *et al.* 1996; Yamada, *et al.* 1998; Smith, *et al.* 2001; Hille, 2001].



Esquema 4. Vía de señalización de las proteínas $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$. Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, el trímero $G\alpha 1\beta 1\gamma 2$ se disocia y la subunidad $G\alpha 1$ inhibe la cascada de señalización de la adenilato ciclasa. Por su parte, el dímero $G\beta 1\gamma 2$ activa los canales GIRK. [Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005]

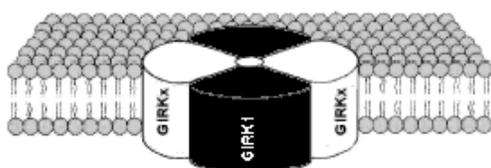
Además del dímero $G\beta\gamma$, la actividad de los canales

GIRK esta controlada por un gran número de moduladores intracelulares como el fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (PIP_2), Na^+ , eicosanoides, ATP, Mg^{2+} , y por fosforilación [Mark y Herlitze, 2000; Bichet, *et al.* 2003;].

5.2. Distribución y función de los canales Kir3 (GIRK).

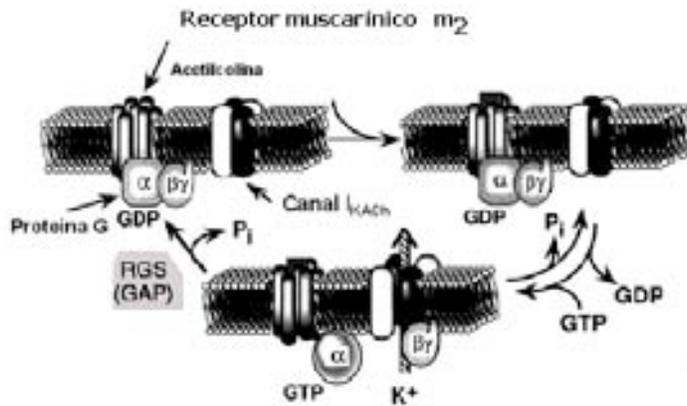
Cinco miembros de la subfamilia GIRK (Kir3.x) han sido clonados hasta la fecha, GIRK1–GIRK4 se han clonado de mamíferos. Los canales de mamífero se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) y en el corazón [Karschin, *et al.* 1997; Sadja, *et al.* 2003]. La isoforma GIRK5 se clonó de los ovocitos de un anfibio, la rana *Xenopus laevis* [Hedin, *et al.* 1996]. El amino terminal y el carboxilo terminal son las regiones en donde se presenta la mayor diferencia entre los miembros de la subfamilia GIRK (Kir3).

Los canales GIRK pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros [Dascal, 1997]. Por lo general forman heterotetrámeros que dan lugar a la formación de canales funcionales con propiedades electrofisiológicas idénticas [Jelacic, *et al.* 1999]. Estos heterotetrámeros se forman por la combinación de dos subunidades GIRK1 con cualquiera de las subunidades de GIRKx; donde x = 2, 3 ó 4 (**Esquema 5**) [Krapivinsky, *et al.* 1995; Dascal, 1997; Jelacic, *et al.* 1999]. Los homotetrámeros de la subunidad GIRK1 no pueden formar canales funcionales [Dascal, 1997].



Esquema 5. Tetrámero compuesto de la subunidad GIRK1 con cualquier otro miembro (GIRKX) de los canales GIRK (GIRK2–GIRK4)

El canal heterotetrámero GIRK1/GIRK4 se localiza en el corazón. La activación del receptor muscarínico m_2 ($AChm_2$) del corazón por la acetilcolina (ACh), disminuye la frecuencia cardíaca por activación específica del canal heterotetrámero GIRK1/GIRK4 (**Esquema 6**). [Loewi, 1921, Krapivinsky, *et al.* 1995; Dascal, 1997]. La liberación de la ACh estimula la aparición de la corriente rectificadora entrante IK_{ACh} registrada en las células marcapaso del nodo sinoauricular.



Esquema 6. Ciclo de activación de los canales GIRK por las proteínas G. Activación y desactivación de los canales GIRK en respuesta a la acetilcolina (ACh). [Modificada de Yamada, *et al.* 1998]

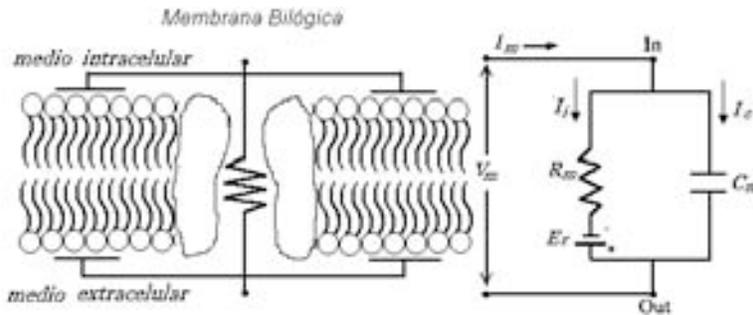
El heterotetrámero GIRK1/GIRK2 se encuentran en diferentes áreas del cerebro como corteza e hipocampo [Karschin, *et al.* 1994; Kobayashi, *et al.* 1994; Liao, *et al.* 1996]. GIRK1/GIRK2 media la disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios [Lüscher, *et al.* 1999; Signorini, *et al.* 1997; Wickman y Clamham 1995; Yamada, *et al.* 1998]. El canal heterotetrámero GIRK1/GIRK3, se expresa en diferentes regiones del cerebro y es efector de varios neurotransmisores como GABA, serotonina, y adenosina [Dascal, 1997; Wickman y Clamham, 1995; Lüscher, *et al.* 1999; Yamada, *et al.* 1998].

GIRK5 es un canal de potasio rectificador entrante endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Hedin y colaboradores (1996) clonaron el DNAc del canal GIRK5 o Kir 3.5 de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, forma heterotetrámeros funcionales con el canal GIRK1 (GIRK1/GIRK5) cuando el ARNm de este último es inyectado en los ovocitos. La secuencia de aminoácidos del canal GIRK5 presenta un 78% de identidad con el canal GIRK4, 72% con el GIRK2, 68% con el GIRK3 y solo el 56% con el canal GIRK1 [Hedin, *et al.* 1996]. En el ovocito el canal GIRK5 forma homotetrámeros "GIRK5/GIRK5". Hasta la fecha se desconoce el papel principal de esta corriente endógena de los ovocitos de *Xenopus laevis* ni del canal GIRK5, pero podría influir en algún proceso de fertilización.

6. Electrofisiología.

6.1. Propiedades eléctricas de las membranas biológicas

Las membranas biológicas presentan propiedades similares a las de un circuito eléctrico (Esquema 7).



Esquema 7. Representación del circuito eléctrico equivalente a la membrana biológica. Los parámetros se dan en el texto.

[Modificado de Johnston y Miao-Sin Wo, 1995]

La bicapa fosfolipídica es una barrera efectiva para el movimiento de partículas cargadas. En contraste, el medio intracelular y extracelular son medios conductores de los iones. Así, la membrana forma un aislante entre dos conductores, por lo que se comporta como un capacitor. Un capacitor puede almacenar carga. El potencial de membrana indica que el lado intracelular es más negativo que el lado extracelular; ambos lados ejercen un campo electromagnético a través de la membrana, que atrae partículas cargadas, los iones negativos (aniones) en el citosol son atraídos por las cargas positivas del exterior y se acumulan cerca de la membrana, mientras que los iones positivos (cationes) se apilan en la superficie. La cantidad de carga almacenada puede ser calculada por

$$Q = V_m C$$

donde Q es la carga almacenada, V_m es la diferencia de potencial a través de la membrana y es la C capacitancia de la membrana.

(6.1)

Esta ecuación muestra que la capacitancia de la membrana es una medida de la capacidad de la membrana para almacenar carga en un potencial dado. [Molleman, 2003]. El aislante eléctrico no es perfecto ya que están los canales iónicos y los transportadores. En otras palabras la resistencia de la membrana (o su recíproca, la conductancia) representa la permeabilidad (la mayor o menor facilidad con que la membrana permite el paso de corriente iónica) a través de la membrana por medio de los canales. [Molleman, 2003; Johnston y Miao-Sin Wo, 1995]. La corriente iónica I que fluye en respuesta a una diferencia de potencial (V) por los canales iónicos (R) se resume en la llamada **Ley de Ohm**

$$I = \frac{V}{R} = GV$$

donde G es la conductancia

(6.2)

Del **esquema 7** se puede escribir la ecuación diferencial para la corriente total que fluye por la membrana, I_m , está compuesta de la corriente capacitiva, I_c , y de la corriente iónica, I_i , que fluyen a través de los canales. C_m , es la capacitancia de la membrana; y V_m , es el potencial de membrana. [Johnston y Miao-Sin Wo, 1995; Kettenmann y Grantyn, 1993]

$$I_m = I_c + I_i = C_m \frac{dV_m}{dt} + I_i$$

(6.3)

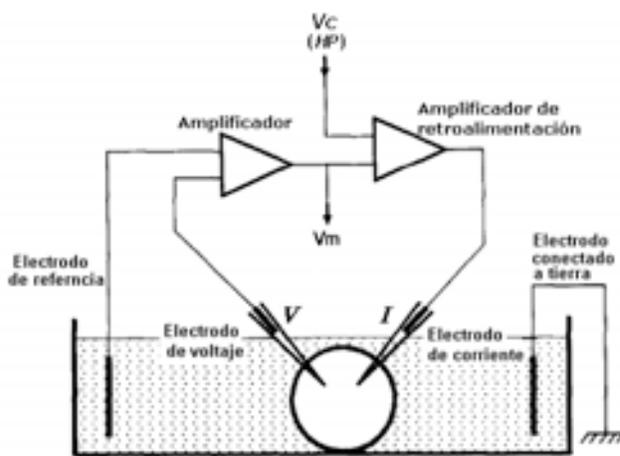
6.2. Métodos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos.

La actividad de los canales iónicos puede ser estudiada mediante la técnica conocida como fijación de voltaje (**Voltage Clamp**), primero ideada por Marmont y Cole y desarrollada y aprovechada por Hodgkin y Huxley en 1952 para trabajar con el axón gigante de calamar. Esta técnica permite registrar solo la corriente iónica, I_i , a través de los canales iónicos por eliminación de la corriente capacitiva, I_c . La forma de hacer esto es mantener el potencial de membrana en un valor constante, para que la corriente capacitiva sea igual a cero: $I_c = C \frac{dV_m}{dt} = 0$. La fijación de voltaje ocurre a través de un amplificador de retroalimentación para mantener el potencial de membrana constante en algún nivel deseado, mientras que, la corriente iónica I_i , que fluye a través de la membrana se mide. [Aidley y Stanfield, 1998; Johnston y Miao-Sin Wo, 1995].

En el sistema de retroalimentación el potencial de membrana medido es comparado con un potencial de mantenimiento que establece el investigador (**holding potential, HP**). Cualquier cambio del potencial de membrana registrado a partir del **HP**, es corregido instantáneamente por inyección de corriente compensatoria para mantener el potencial deseado en el circuito constituido por la membrana plasmática. Esta corriente es entonces una representación exacta en magnitud (pero opuesta en signo) de la corriente iónica a través de la membrana plasmática, por lo que, la corriente iónica necesaria para mantener un potencial dado es el parámetro medido [Molleman, 2003; Stühmer, 1992].

Las corrientes registradas son las corrientes sumadas de varios centenares de canales o más, éstas son llamadas corrientes macroscópicas. [Aidley y Stanfield, 1998].

Es usual tener dos microelectrodos intracelulares (*fijación de voltaje con dos microelectrodos*), uno para registrar el voltaje y otro para inyectar corriente (**Esquema 8**). La técnica obviamente requiere células grandes y es usada para el trabajo con los ovocitos. Este procedimiento se realiza repetidamente, en intervalos de tiempos moderados, el potencial de membrana puede ser despolarizado o hiperpolarizado desde HP, hasta un valor del potencial de membrana predeterminado que puede variar (*voltage command, Vc,*) por ejemplo desde -100 mV hasta 100 mV; y registrar la cinética de las corrientes iónicas. [Molleman, 2003; Aidley y Stanfield, 1998]



Esquema 8. Circuito de fijación de voltaje con dos microelectrodo en ovocitos de *Xenopus laevis*. Electrodo que registra el potencial (V) y el electrodo que inyecta corriente (I) están insertados en la célula bajo investigación en una solución salina fisiológica. [Modificado de Stühmer, 1992].

V_m : Potencial transmembranal

V_c : Comando de voltaje

HP: Potencial de mantenimiento.

La mayoría de los circuitos de fijación de voltaje también usan un electrodo de referencia para la solución del baño. Esto evita errores de polarización que surgen de la corriente que pasa a través del electrodo conectado a la tierra. [Stühmer, 1992]. En esta configuración, el potencial transmembranal (V_m) se toma como la diferencia entre el electrodo que registra el potencial intracelular (V) y el electrodo de referencia. V_m es comparado con el potencial de mantenimiento, o con el potencial comando, y cualquier diferencia es inyectada en el ovocito a través del electrodo de corriente. Esta corriente fluye a la conexión con tierra a través del electrodo conectado a tierra. Si V_m es igual a HP o V_c , no fluye corriente a la conexión a tierra. [Stühmer, 1992].

7. Expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de la rana sudafricana *Xenopus laevis* normalmente son usados en la investigación biológica, farmacológica y electrofisiológica (señalización intracelular, rutas bioquímicas y transporte). Gurdon, *et al.* 1971 demostró que el ácido ribonucleico mensajero exógeno (ARNm) inyectado en los ovocitos de *X. laevis* puede ser traducidos y se expresan proteínas funcionales incluyendo modificaciones post-traduccionales. Miledi (1983) utilizó los ovocitos para la expresión de los receptores y los canales iónicos [Miledi, *et al.* 1983]. La ventaja principal del uso de los ovocitos surge de la facilidad de su manejo y sus altos niveles de expresión de las proteínas exógenas (Tzounopoulos, *et al.* 1995). Para la mayoría de los experimentos, los ovocitos de *X. laevis* en los estadios V - VI son óptimos porque son grandes (1-1.3 mm de diámetro) por lo que facilitan la manipulación para la inyección del ARNm y la inserción con múltiples electrodos para el registro (**Esquema 9**). Además de su capacidad especial de traducción, los ovocitos tienen la habilidad de insertar las proteínas en la membrana plasmática y generar respuestas electrofisiológicas [Holding, 1992; Stühmer, 1992; Gurdon, *et al.* 1971].



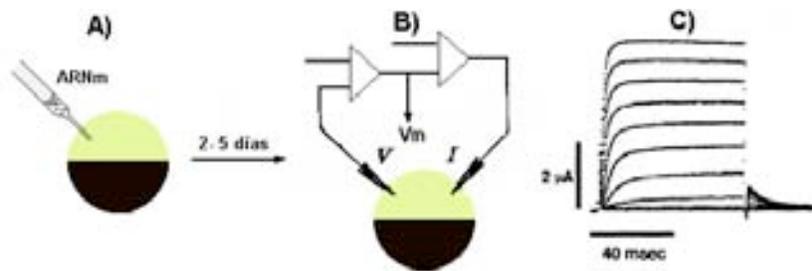
Esquema 9. Ovocito en los estadios V-VI. Los ovocitos tienen dos regiones distintas: el polo “vegetal” amarillento y el polo “animal” café oscuro.

bitesizebio.com

Aunque los ovocitos de *X. laevis* poseen receptores, sistemas de transporte y canales iónicos endógenos éstos han llegado a ser un sistema de expresión heteróloga para la investigación y la caracterización de incontables proteínas transportadoras, receptores y canales iónicos. Los canales iónicos endógenos principales incluyen a los de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ [Miledi 1982], de Ca²⁺ dependientes de voltaje [Miledi, 1982; Barish, 1983], de potasio del tipo rectificador tardío [Lu, *et al.* 1990] y de potasio del tipo rectificador entrante [Bauer, *et al.* 1996]. Los canales iónicos expresados en los ovocitos pueden ser investigados electrofisiológicamente por técnicas como fijación de voltaje con dos microelectrodos para registro de la célula completa. Ventajosamente, los canales iónicos expresados heterológicamente pueden distinguirse claramente de los endógenos, las corrientes generadas por los canales iónicos endógenos son insignificantes comparadas con

las producidas por los canales recombinantes [Rigel, 1990; Stühmer, 1992; Weber, 1999], así, los ovocitos son muy útiles para la observación del funcionamiento de muchos canales [Aidley y Stanfield, 1998].

El **esquema 10** muestra los pasos involucrados en la preparación de los ovocitos para los registros electrofisiológicos de los canales iónicos exógenos. Primero los ovocitos se inyectan con ARNm. Después de la microinyección, los ovocitos se incuban a 18°C. La expresión de los canales exógenos se adquiere aproximadamente de 2 a 5 días después de la microinyección, por lo que los registros electrofisiológicos en los ovocitos se efectúan en ese período de tiempo [Fraser, 1997].



Esquema 10. Expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* A) Microinyección del ARNm en el ovocito. B) Registro de la corriente de los canales iónicos expresados por fijación de voltaje con dos microelectrodos. C) Corrientes salientes registradas. [Modificado de Aidley, *et al.* 1998]

Con el desarrollo de la Biología Molecular ha sido posible clonar ADNc que codifica para varios receptores y canales, y transcribir ARNm *in vitro* a partir del ADNc [Stühmer, 1992].

8. Biología Molecular.

8.1. “Mutagénesis *in vitro*”.

En los estudios sobre la relación de la estructura/función de las proteínas una herramienta muy útil de la Biología Molecular es la **mutagénesis de sitio dirigida**. Este método permite generar mutaciones específicas en sitios concretos de un gen de secuencia conocida al cambiar el codón de un aminoácido determinado por el deseado [Griffiths, *et al* 2002]. La estrategia de la mutagénesis del “scanning” de alanina consiste en la sustitución sistemática de un aminoácido de una proteína nativa o silvestre “wild-type” (canal iónico o receptor) por un residuo de alanina [Cunningham y Wells, 1989]. La sustitución puede ser no

dirigida, pero es más a menudo la sustitución dirigida en aminoácidos específicos que se consideran importantes en determinar la función de la proteína [Raffa, 2002, He, *et al.* 2004]. Cada sustitución produce una mutante del receptor o canal iónico silvestre [Raffa, 2002]. La alanina se escoge porque le falta la cadena lateral del aminoácido nativo más allá del carbono β y así poder evaluar el impacto de su ausencia; no altera significativamente la conformación principal de la cadena; y no impone efecto electrostático o efecto estérico [Cunningham y Wells, 1989].

9. Tráfico Vesicular Intracelular.

Una célula necesita regular el nivel de los transportadores, los receptores y los canales iónicos en su membrana plasmática para mantener su homeostasis, tanto estructural como funcional, detectar cambios ambientales y comunicarse con otras células.

La internalización y el reclutamiento juegan un papel importante en la determinación de la densidad de las proteínas de membrana. La internalización utiliza “señales”, localizadas en las proteínas que permiten a la célula controlar selectivamente el nivel en su superficie de los transportadores, receptores y canales iónicos particulares [Gong, *et al* 2007].

9.1. Transporte de vesículas.

A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas poseen un complejo sistema de membranas que consiste en los diferentes organelos. El tráfico de membranas es el proceso dinámico responsable de la biogénesis y de la organización de los organelos, así como de la comunicación entre estos y con el exterior celular mediante numerosas *vesículas de transporte* [Kirchhausen, 2002].

El transporte de proteínas de membrana de un organelo a otro es mediado por estas vesículas de transporte. Las proteínas están concentradas en una región revestida especializada de la membrana del organelo progenitor (donador) y son empacadas dentro de una vesícula naciente. Las vesículas de transporte brotan como vesículas revestidas de proteínas desde la membrana de un organelo progenitor, son transportadas por el citoplasma y se fusionan con la membrana de un organelo blanco (aceptor) [Nakatsu y Ohno, 2003; Lodish, *et al.* 2004; Alberts, *et al.* 2002]. Las vesículas de transporte pueden ser esféricas, tubulares o túbulo-vesicular. Hay tres tipos de vesículas revestidas bien

caracterizadas que se diferencian por sus proteínas de cubierta [Lodish, *et al.* 2004; Alberts, *et al.* 2002]:

- **Las vesículas revestidas de COPI** (del inglés Coat protein complex I); Transportan proteínas en la dirección retrógrada entre las cisternas del Golgi y desde el *cis*-Golgi de regreso hacia el retículo endoplásmico (RE) rugoso.
- **Las vesículas revestidas de COPII** (del inglés Coat protein complex II); transportan proteínas desde el RE rugoso hacia el complejo de Golgi.
- **Las vesículas revestidas de clatrina**; median el transporte vesicular selectivo de proteínas desde la membrana plasmática y la red del *trans*-Golgi (**TGN, *trans*-Golgi network**) hacia endosomas tardíos.

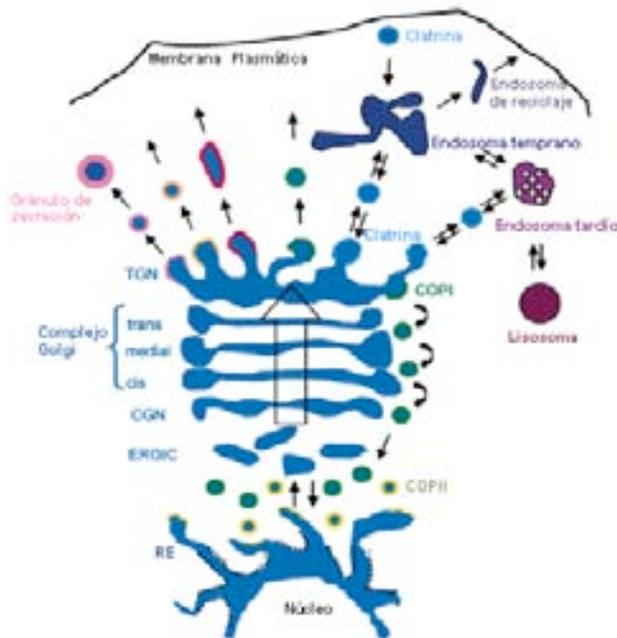
Entre las proteínas importantes que regulan el tráfico del transporte vesicular, están el complejo de proteínas adaptadoras (del inglés **AP; adaptor-protein**). Los complejos AP juegan un papel importante en la selección de las proteínas de membrana, así como en la formación de la vesícula [Nakatsu y Ohno, 2003]

Las vesículas revestidas de clatrina están constituidas por la proteína clatrina y por un complejo AP que son los responsables de la localización o clasificación de las proteínas. Los complejos AP interactúan con las señales de localización requeridas para dirigir el tráfico de las proteínas en las rutas de clatrina.

Las vesículas de clatrina que se forman en la membrana plasmática se asocian al complejo AP-2 y las formadas en el TNG al AP-1. [Kirchhausen, 2002; Lodish, *et al.* 2004, Alberts, *et al.* 2002].

9.2. Rutas del tráfico para la distribución de las proteínas.

Las principales rutas por las que se lleva a cabo este transporte proteico son la **ruta biosintética – secretora** y la **ruta endocítica** (**Esquema 11**). Ambas rutas son críticas para la biogénesis y función de los organelos.



Esquema 11. Rutas biosintética- secretora y endocítica de una célula eucariota. Las flechas muestran la ruta del transporte proteico. La Ruta biosintética- secretora se dirige al exterior desde el RE hacia el complejo Golgi y a la superficie celular con una desviación hacia lisosomas, mientras que en la vía endocítica se dirige hacia el exterior desde la membrana plasmática.

[Modificada de van Vliet, *et al.* 2003]

TGN: trans-Golgi network

CGN: cis-Golgi network

ERGIC: Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment

9.2.1. Ruta biosintética–secretora: Una vez que las proteínas se sintetizan en los ribosomas unidos al RE, se incorporan a la luz o se insertan en la membrana del mismo, pueden empaquetarse dentro de las vesículas de transporte que brotan desde el RE y fusionarse entre sí para formar el ERGIC (Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment). Numerosos ERGIC geman para formar nuevas cisternas del *cis*-Golgi (*cis*, *medial* y *trans*). Las proteínas se transportan entonces a través de estas cisternas y alcanzan a la red del *trans*-Golgi, en este sitio, las proteínas se clasifican y son enviadas hacia sus diferentes destinos: membrana plasmática (apical o basolateral), medio extracelular, gránulos de secreción y lisosomas [Lodish, *et al.* 2004, van Vliet, *et al.* 2003]. La red del *trans*-Golgi también es el sitio donde las rutas biosintética y endocítica convergen [van Vliet, *et al.* 2003].

9.2.2. Ruta endocítica: Las vesículas endocíticas brotan desde la membrana plasmática trayendo las proteínas de membrana hacia el interior de la célula. Luego de ser internalizadas, algunas proteínas son transportadas a los endosomas tempranos donde una clasificación extensa toma lugar. Las proteínas pueden reciclarse a la membrana plasmática (vía endosomas de reciclamiento o vía TGN) o ser transportadas al TGN o ir a lisosomas (vía endosomas tardíos) para su degradación. Así, el endosoma temprano y el TGN

representan las dos mejores estaciones de clasificación de la célula [Bonifacino y Traub, 2003; Lodish, *et al.* 2004; Maxfield y McGraw, 2004; van Vliet, *et al.* 2003].

El proceso de internalización de componentes de membrana mejor conocido es el de la endocitosis mediada por receptor, el cual utiliza vesículas recubiertas de clatrina/AP-2.

9.3. Señales de localización de las proteínas.

La operación apropiada de estas rutas de tráfico requiere que varias señales de localización en las proteínas se “manifiesten” a lo largo de la ruta. Estas decisiones son gobernadas por un sistema complejo de señales en las proteínas, referidas como “señales de localización”, ya que determinan que ruta del tráfico vesicular es usada para transportar una molécula particular, así como su transporte y los mecanismos que reconocen aquellas “señales” y que distribuyen a las proteínas a diferentes destinos finales (*sorting* y *targeting*) [Kirchhausen, 2002; Bonifacino y Traub, 2003].

Tabla 3. Señales de localización dirigidas al sistema endosomal/lisosomal y sus proteínas de reconocimiento.

Tipo de señal	proteínas o dominios de reconocimiento	Funciones
NPXY	Dominio terminal de Clatrina, subunidad $\mu 2$ de AP-2, dominio PTB de Dab2	Internalización
YXX \emptyset	subunidad μ del complejo AP	Internalización, distribución (<i>targeting</i>) lisosomal, y basolateral
[DE]XXXL[LI]	Subunidad μ y/o β del complejo AP	Internalización, distribución (<i>targeting</i>) lisosomal, y basolateral
DXXLL	Dominio VHS de las GGA _s	Localización (<i>sorting</i>) de TNG a endosomas
Grupo de aminoácidos ácidos	PACS-1	Localización (<i>sorting</i>) de endosomas a TNG
NPF _X (1,2)D	Dominio SHD1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S1a1p	Internalización
Ubiquitina	Dominios UIM, UBA, and UBC	Internalización, distribución (<i>targeting</i>) lisosomal/vacuolar

Los residuos de aminoácido: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina, I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, el methionine; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptofano, y Y, tirosina. X representa cualquier aminoácido y \emptyset un residuo de aminoácido voluminoso e hidrófobo.

Modificado de Bonifacino y Traub, 2003

Estudios Genéticos y de Biología Celular han establecido claramente que el tráfico intracelular de muchas proteínas de membrana requiere de señales de localización

contenidas en sus dominios citoplasmáticos [Kirchhausen, 2002; Bonifacino y Traub, 2003; Lodish, *et al.* 2004]. En general las señales consisten de cortos arreglos lineares de residuos de aminoácidos que no son secuencias conservadas sino motivos degenerados de cuatro a siete residuos de los que dos o tres son a menudo críticos para la función. Los residuos críticos son generalmente voluminosos e hidrófobos, aunque los residuos cargados también son determinantes importantes de especificidad para algunas señales [Bonifacino y Traub, 2003]. Hasta ahora se reconocen dos clases de señales de localización endosomal-lisosomal: las de tirosina (YXXØ; NPXY) y las de dileucina ([DE]XXXL[LI]; DXXLL) [Trowbridge, *et al.* 1993; Kirchhausen, *et al.* 1997; Dietrich, *et al.* 1997; Collins, *et al.* 2002; Bonifacino y Traub, 2003]. Las señales de localización presentes en las proteínas de membrana que son dirigidas principalmente al sistema endosomal/lisosomal, y sus proteínas o dominios que reconocen esta señal se muestran en la **Tabla 3**.

9.3.1. Señales tipo dileucina:

El motivo del tipo dileucina está involucrados en la localización, la internalización y la distribución de numerosos receptores a la membrana plasmática basolateral y lisosomal [Bello, *et al.* 2001; Bonifacino y Traub, 2003; Stockklausner y Klöcker, 2003]. EL motivo del tipo dileucina requiere dos leucinas consecutivas (LL) o un par leucina-isoleucina (LI) [Letourneur y Klausner, 1992; Sandoval y Bakke, 1994].

Estudios recientes han identificado dos distintas clases de señales basadas en dileucina representadas por las secuencias consenso [DE]XXXL[LI] y DXXLL. Proteínas como el receptor GLUT4, (del inglés Glucose Transporter type 4), tienen una señal de tipo [DE]XXXL[LI]; mientras que la señal DXXLL ha sido identificada en proteínas relacionadas con el receptor de LDL (del inglés LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor), [Bonifacino y Traub, 2003].

Sobresale el hecho que de que esta señal, únicamente ha sido identificada en receptores internalizados desde la membrana plasmática (**Tabla 4**) y en receptores clasificados desde el TNG a endosomas/ lisosomas [Dietrich, *et al.* 1997], y que esta señal basada en dileucina no se ha reportado en ningún canal iónico.

Tabla 4. Señales del tipo [DE]XXX[LI]

Proteína	Especies	Señal
CD3- γ	Humano	Tm-8- SDKQTL LPN-26
LIMP-II	Rata	Tm-11- DERAP LIRT
VMAT2	Humano	Tm-6- EKMAIL MD-29
VMAT1	Humano	Tm-6- EKLA ILSQ-32
CD4	Humano	Tm-12- SQIKR LLSE-17
CD4	Gato	Tm-12- SHIKR LLSE-17
GLUT4	Ratón	Tm-17- RRTPS LLEQ-17
GLUT4	Humano	Tm-17- HRTPS LLEQ-17
IRAP	Rata	46- EPGRS RLLVR-53-Tm
Ii	Humano	MDDQRDLIS NNEQLPMLGR-11-Tm
Ii	Ratón	MDDQRDLIS NHEQLPILGN-10-Tm
Ii	Pollo	MAEEQRDLIS SDGSSGVLPI-12-Tm
NPC1	Humano	Tm-13- TERER LLNF
AQP4	Humano	Tm-32- VETDD LIL-29

Los residuos importantes se indican en negritas.
 Los números de aminoácidos antes (N-terminal) y después (C-terminal) de las señales están indicados.
 Abreviaciones: Tm: Transmembrana

Modificado de Bonifacino y Traub, 2003

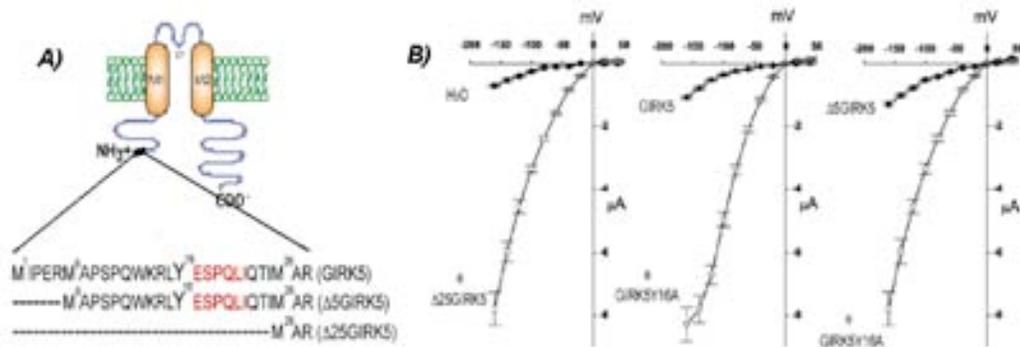
Los motivos dileucina de la forma [DE]XXXL[LI] son señales reconocidas por los complejos APs [Heilker, *et al.* 1996; Honing, *et al.* 1998; Le Borgne, *et al.* 1998; Peden, *et al.* 2001]. El proceso de internalización utiliza vesículas recubiertas de clatrina/AP-2 [Mousavi, *et al.* 2004; Lodish, *et al.* 2004; Gong, *et al.* 2007]. La señal [DE]XXXL[LI] favorece el transporte retrógrado de proteínas que involucra al complejo adaptador de proteínas 2 (AP-2) [Kinlough, *et al.* 2004]. Durante la endocitosis mediada por clatrina, las proteínas en la superficie celular se seleccionan principalmente por el complejo AP-2 para su inclusión en vesículas recubiertas por clatrina [Royle, *et al.* 2005].

10. El Canal GIRK5.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V y VI, son el sistema de expresión heteróloga más utilizado. Los ovocitos expresan de manera endógena al canal de potasio GIRK5. Se ha observado que la amplitud de la corriente endógena de 0.1 hasta cerca de 2 μ A (nuestros resultados) y en algunos lotes de ovocitos es difícil detectarla [Bauer, *et al.* 1996].

El canal GIRK5 se clonó a partir de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Hedin *et al.* 1996]. El gen del canal GIRK5 puede dar lugar a tres isoformas, GIRK5, Δ 5GIRK5 y Δ 25GIRK5 cuya diferencia radica principalmente en la longitud de la región amino

terminal. Únicamente el canal $\Delta 25$ GIRK5 forma homotetrámeros funcionales (**Esquema 12B**) con una corriente entrante que sobrepasa los 5 μ A a -160 mV [Salvador, *et al.* 2001 y 2003].



Esquema 12. Expresión de los canales GIRK5. A) secuencia de los primeros 25 aminoácidos de las isoformas del canal GIRK5. B) Relación corriente- voltaje (I-V) de los canales GIRK5 silvestres y mutantes. En rojo se muestra el motivo de endocitosis del tipo dileucina representada por la secuencia consenso [DE]XXX[LI]. [Modificado de Mora y Escobar, 2005]

Los canales GIRK5 y $\Delta 5$ GIRK5 poseen un residuo de tirosina (Y16) (**Esquema 12A**) en los primeros 25 aminoácidos de la región amino terminal [Mora y Escobar, 2005]. En el laboratorio se mutó la Y16 por la alanina (A). El canal mutante “GIRK5Y16A” fue funcional (**Esquema 12B**).

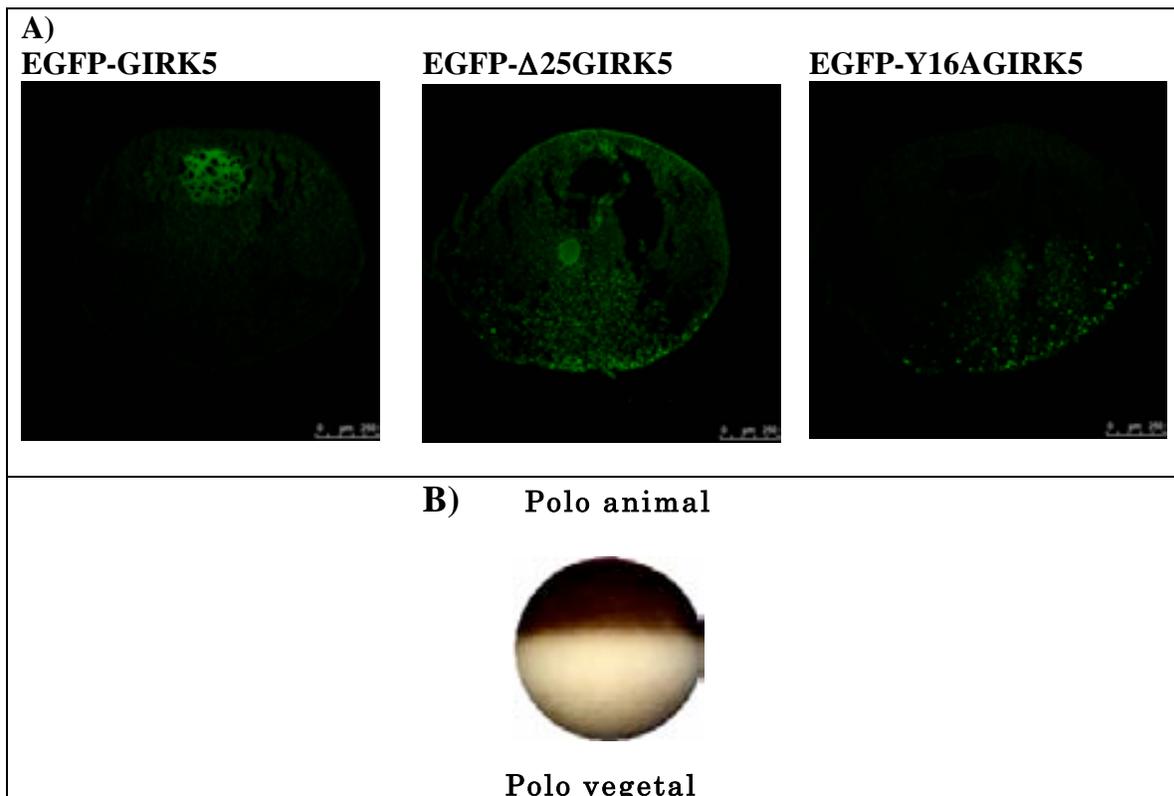
Por otra parte, las quimeras de los canales GIRK5 con la proteína verde fluorescente (del inglés EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein) fueron realizadas por Mora y Escobar (2005): EGFP-GIRK5 (quimera de la EGFP con el canal GIRK5 completo). La unión de la EGFP quedó en el amino terminal de las proteínas., EGFP- $\Delta 25$ GIRK5 (quimera que contiene al canal sin los primeros 25 aminoácidos) y EGFP-Y16AGIRK5 (quimera que contiene la mutación puntual de la tirosina 16 por una alanina) llamada EGFP-Y16AGIRK5. Los ovocitos inyectados con agua y con el ARN de los canales con la proteína de fusión EGFP (GIRK5, GIRK5Y16A y $\Delta 25$ GIRK5) se incubaron con geldanamycin (75 nM), un inhibidor de cinasas de tirosinas, se concluyó que la fosforilación de la Y16 está implicada en la expresión funcional de los canales GIRK5 en la membrana plasmática [Mora y Escobar, 2005].

Los resultados indicaron que el residuo de tirosina (Y16), localizado en la región del amino terminal, al ser fosforilado por la c-Src endógena mantiene al canal **endocitado** (**internalizado**) y por tanto regula el tráfico del canal GIRK5 a la membrana plasmática.

El canal GIRK5 presenta una señal del tipo dileucina representada por la secuencia consenso **ESPQLI** en la región del N-terminal (**Esquema 12A**) la cual está acotada por la tirosina fosforilable (Y16), que al parecer es el motivo mediante el cual el canal GIRK5 puede ser endocitado.

En la **tabla 5** se observa que la expresión de las proteínas quiméricas permitió comprobar por microscopía confocal que existe una distribución diferente de las proteínas dependiendo de su secuencia. En A) se observó que la quimera con $\Delta 25$ GIRK5 se encontró con una distribución uniforme sobre toda la superficie del ovocito, la de GIRK5 se mantiene retenida en una estructura subcelular y la de Y16AGIRK5 se encuentra polarizada (datos no publicados; tesis de Maestría de Beatriz Díaz Bello).

Tabla 5. Distribución diferente de los canales recombinantes GIRK5. A) Imágenes de microscopía confocal para EGFP-GIRK5, EGFP- $\Delta 25$ GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5. Día 5 de expresión, la barra inferior equivale a 250 μ m. B) Orientación del ovocito de la rana *X. laevis*.



En todas las figuras, en cada corte de los ovocitos con las muestras EGFP-Δ25GIRK5, EGFP-GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5 se muestra las diferencias de la distribución de las proteínas (Tabla 5, A). En la recepción de imágenes en el microscopio confocal, la orientación del ovocito resulta con el polo animal en la parte superior y el polo vegetal en la parte inferior (Tabla 5, B).

Este trabajo demostró por primera vez en la literatura la localización asimétrica de un canal iónico generada por un motivo de dileucina y que el motivo de internalización o de localización EXXXLI esta acotado por una tirosina fosforilable.

11. Justificación

Los canales GIRK5 se expresan endógenamente en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Hasta el momento, se dispone de poca información acerca del papel fisiológico del canal GIRK5 en los ovocitos. En los estadios V y VI los ovocitos se mantienen arrestados en la fase G2 de la meiosis I. La fosforilación de la Y16 en el canal GIRK5 puede ser una señal para mantener bajos niveles de expresión del canal GIRK5 en la membrana plasmática de los ovocitos y, de esa manera, puedan ayudar a mantener a los ovocitos arrestados en la fase G2 del ciclo celular. La tirosina 16 (Y16) está adyacente a un motivo de endocitosis del tipo dileucina representado por las secuencias consenso YDXXXLI. Hasta la fecha no se ha reportado que estos motivos estén acotados por residuos de tirosina fosforilable. Es por ello que resulta importante conocer si la internalización del canal GIRK5 está mediada por la secuencia consenso **ESPQLI** del N-terminal; lo que explicaría el tráfico intracelular del canal GIRK5 en el ovocito. Para determinar si este es el motivo de internalización del canal GIRK5, se realizaron mutaciones puntuales dirigidas en los aminoácidos S18, P19 y Q20 por alanina.

12. Hipótesis

Si la señal de endocitosis es del tipo EXXXLI, al mutar los residuos de serina (S), prolina (P) y glutamina (Q) en la secuencia ESPQLI del amino terminal del canal GIRK5, los canales mutantes **no** serán funcionales. Por el contrario, si se mutan el glutamato (E) o la leucina (L) e isoleucina (I), los canales GIRK5 podrán llegar a la membrana plasmática y permitir el influjo de K⁺ a voltajes por debajo del potencial de equilibrio de este catión.

13. Objetivos

13.1. Objetivo General

- ❖ Determinar si las mutantes del canal de potasio GIRK5: GIRK5S18A, GIRK5P19A y GIRK5Q20A son funcionales.

13.2 Objetivos particulares

- ❖ Expresar los canales mutantes GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.
- ❖ Registrar las corrientes entrantes de K^+ de los canales en los ovocitos por la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos.
- ❖ Analizar los registros electrofisiológicos con el programa Origin.

14. Metodología.

La estrategia general a seguir en este trabajo se resume en el esquema.



o de la estrategia experimental llevada a cabo en este estudio.

14.1. Biología Molecular

14.1.2. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR.

El ADN complementario (ADNc) del canal GIRK5 fue clonado de los ovocitos de *Xenopus laevis* por la M. en C. Carolina Salvador (Salvador, *et al.* 2001).

La amplificación del ADNc del canal GIRK5 se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés PCR: Polimerase Chain Reaction; Erlich 1992; Weiner *et al* 1995; Zhu 19925 y 1997) utilizando los iniciadores sentido GIRK5 y el iniciador antisentido Low 2 (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de los iniciadores de los extremos utilizados.

Iniciadores de los extremos
¹ GIRK5 (sentido) 5' AAA GGT CGA CAT GAT TCC TGA AAG AAT GGC ^{3'}
SP6 (sentido) 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG ^{3'}
¹ Low2 (antisentido) 5' AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTCGCC TGT ATC AAA G ^{3'}

1= Diseñados por la M. en C. Carolina Salvador

Las mutaciones puntuales de la S18, P19 y Q20 por alanina (S18A, P19A Y Q20A), en los canales GIRK5, se realizó mediante la técnica de mutagénesis dirigida por PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los iniciadores mutagénicos de 21 bases para cada uno de los residuos a mutar S18A, P19A Y Q20A (5' y 3' [up (sentido) y low

(antisentido)]; **Tabla 7**). Se utilizaron los primers SP6 (sentido) y Low2 (antisentido) como iniciadores de los extremos (**Tabla 6**).

Tabla 7. Secuencia de los iniciadores mutagénicos sentido (up) y antisentido (low) utilizados.

Iniciador 5'	Iniciador 3'
Mutante: ¹GIRK5S18A	
(S18Aup) 5' TTG TAT GAG GCG CCA CAA CTC ^{3'}	(S18Alow) 5' GAG TTG TGG CGC CTC ATA CAA ^{3'}
Mutante: ²GIRK5P19A	
(P19Aup) 5' G TAT GAG TCA GCA CAA CTC ATC ^{3'}	(P19Alow) 5' GAT GAG TTG TGC TGA CTC ATA C ^{3'}
Mutante: ¹GIRK5Q20A	
(Q20Aup) 5' GAG TCA CCA GCG CTC ATC CAA ^{3'}	(Q20Alow) 5' TTG GAT GAG CGC TGG TGA CTC ^{3'}

1= Diseñados por la M. en C. Carolina Salvador

2= Diseñados por la Dra. Ivonne Mora

El diseño de los iniciadores mutagénicos se muestra en la **Tabla 8**.

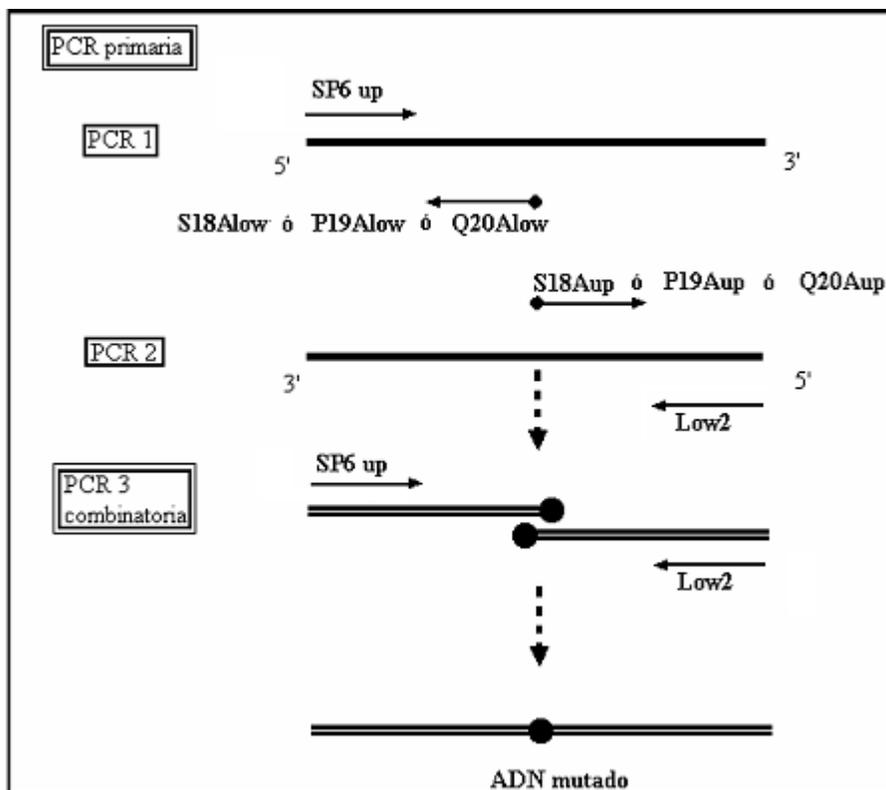
Tabla 8. Diseño de los iniciadores mutagénicos.

ADN silvestre del canal GIRK5							
...15	16	17	18	19	20	21	22...
5' TTG	TAT	GAG	TCA	CCA	CAA	CTC	ATC ^{3'}
3' AAC	ATA	CTC	AGT	GGT	GTT	GAG	TAG ^{5'}
Mutaciones puntuales:							
TCA = S		CCA = P		CAA = Q			
GCG = A		GCA = A		GCG = A			
ADN Mutante S18A							
Iniciador 5' (S18Aup)							
5' TTG	TAT	GAG	GCG	CCA	CAA	CTC ^{3'}	
ADN Mutante P19A							
Iniciador 5' (P19Aup)							
5' G	TAT	GAG	TCA	GCA	CAA	CTC	ATC ^{3'}
ADN Mutante Q20A							
Iniciador 5' (Q20Aup)							
	5' GAG	TCA	CCA	GCG	CTC	ATC	CAA ^{3'}

En el **Esquema 14** se muestra la estrategia a seguir para obtener los canales mutados. Inicialmente se realizaron dos amplificaciones del ADN (PCR primaria) con diferentes iniciadores para obtener dos fragmentos de 21 pares de bases incluyendo la mutación deseada (**Esquema 14, PCR 1 y PCR 2**).

En la primera amplificación (**PCR 1**) se utilizó el iniciador 5' SP6 (sentido) y el iniciador 3' mutagénico (S18A_{low} ó P19A_{low} ó Q20A_{low}). En la segunda amplificación (**PCR 2**) se utilizó el iniciador 5' mutagénico (S18A_{up} ó P19A_{up} ó Q20A_{up}) y el iniciador 3' low2 (antisentido).

En una tercera amplificación (**PCR3 combinatoria**) se emplearon como molde de ADN los fragmentos obtenidos en la PCR 1 y PCR 2 para cada canal mutante. En esta amplificación los iniciadores a los extremos utilizados fueron el “5' SP6 (sentido) y el 3' low2 (antisentido)” (**Esquema 14, PCR3 combinatoria**). Los fragmentos se recombinaron en sus 21 bases que comparten y se amplificaron con los iniciadores a los extremos.



Esquema 14. Estrategia a seguir para obtener los fragmentos mutados “S18A, P19A y Q20A”. En la PCR primaria (PCR1 y PCR2) se generan los fragmentos mutados que sirven de molde para la PCR 3 combinatoria.

El iniciador con la mutación puntual se introdujo en el ADNc del canal GIRK5 silvestre en el sitio de la enzima de restricción NcoI. Los ADNc de los canales mutantes de GIRK5 fueron subclonados en el vector PBF (pRSSP6013A3-UWE).

Los ADNs de cada mutante se secuenciaron con la técnica automatizada de electroforesis capilar con el equipo AB1 Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

14.2. Obtención y manejo de los ovocitos.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V-VI se obtuvieron por ovariectomía parcial. Los ovocitos se desfolicularon mediante una digestión enzimática con colagenasa tipo 1A (2 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) disuelta en medio ND96 libre de calcio (mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, pH 7.4) por 1 hora a una temperatura de 21-23°C. Los ovocitos se mantuvieron a 18°C en medio ND96 (mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 0.05 mg/ml de gentamicina, pH 7.4).

14.3. Microinyección.

Los ovocitos se inyectaron con 50 nl de ARNc (25 ng por ovocito). Los ovocitos inyectados con 50 nl de agua fueron utilizados como control.

14.4. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.

Dos a cuatro días después de la inyección, los ovocitos se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp). Se utilizó un convertidor analógico digital (DIGIDATA 1322A), un amplificador (Geneclamp 500B), el software (pClamp 8.0) todos de Axon Instruments Inc. Foster City, CA, y una PC pentium III (Intel) para la adquisición de los registros. Las corrientes totales se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de 12 pulsos, cada uno con una duración de 100 ms a un potencial de mantenimiento de 0 mV. Los pasos de voltaje aplicados fueron desde -160 a +60 mV. Los ovocitos se empalaron con dos microelectrodos con resistencias de 0.5 a 2 MΩ. Las pipetas de registro se llenaron con una solución 3 M de KCl.

Una solución alta en potasio se utilizó como medio de registro (mM: 118 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4). La adquisición de los datos y el análisis de los registros se realizaron con el software pClamp 8.0.

14.5. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con los paquetes pClamp8 (Axon) y Origin 7.5 (Origin lab. Corporation, USA). Las curvas de la corriente (I en μA) contra el voltaje (V en mV) muestran los valores promedio y la desviación estándar de los registros de un número (n) de experimentos individuales. La prueba t-student se empleó para comparar las diferencias significativas entre los experimentos con una $p < 0.01$.

15. Resultados

15.1. Expresión de los canales en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

Para examinar el papel de los aminoácidos en la secuencia ESPQLI en el N-terminal del canal GIRK5, los residuos S18, P19 y Q20, se mutaron uno a uno al aminoácido hidrofóbico de alanina: S18A, P19A y Q20A (**Figura 1**).

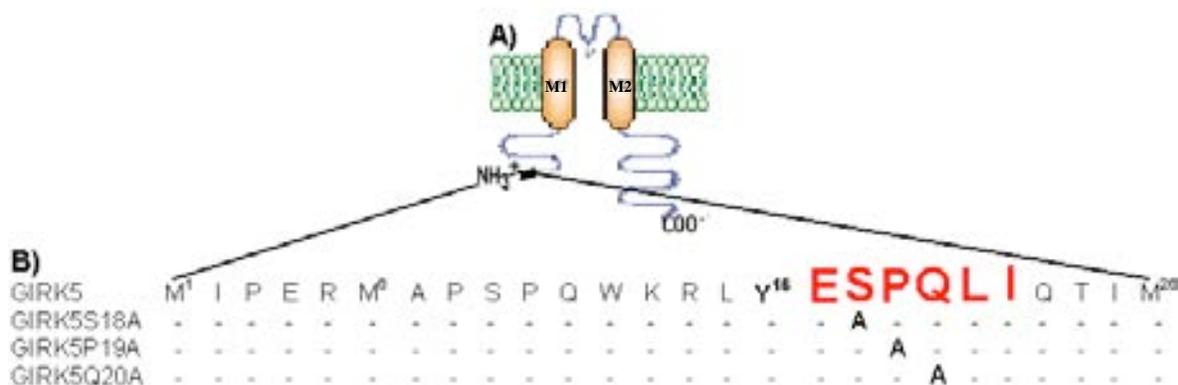


Figura 1. Estructura de las mutaciones del canal GIRK5.

A) Representación esquemática del canal GIRK5, M1 y M2 son los segmentos transmembranales con la región del poro (P) entre ellos. B) Secuencia de los primeros 25 aminoácidos en la región del N-terminal del canal GIRK5 y sus mutantes. Los aminoácidos convertidos a alanina están indicados como "A". El motivo basado en dileucina [D/E]XXX[L/I] está indicado en rojo.

El sistema de expresión empleado fueron los mismos ovocitos de la rana *Xenopus laevis* ya que la corriente endógena GIRK5 nunca rebasa los 0.8 μ A cuando llega a registrarse. Por otra parte, en un trabajo previo del laboratorio se demostró que los canales truncados Δ 25GIRK5 también son funcionales en células de insecto [Salvador, *et al.* 2003]. En consecuencia, y por nuestro interés en caracterizar el papel fisiológico de estos canales en el ovocito, éstos se utilizaron en el estudio de los canales GIRK5 recombinantes.

Los ovocitos fueron extraídos por cirugía bajo anestesia hipotérmica y separados enzimáticamente de los tejidos adyacentes. Posteriormente, una muestra de ovocitos maduros se seleccionó al azar y cada célula se inyectó con 25 ng de RNA mensajero (RNAm) que codifica para los canales mutantes. Estudios previos del laboratorio demostraron que la cantidad de ARNm inyectado en los ovocitos tiene efecto en el nivel de expresión de los canales Δ 25GIRK5; ya que entre más cantidad de ARNm es inyectado más corriente se registra [Salvador, *et al.* 2003; Mora y Escobar, 2005]. Por tanto, para tener expresión de los canales se inyectaron concentraciones altas de ARNm (25 ng).

15.2. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.

Para estudiar la función de los canales mutantes se registraron las corrientes macroscópicas con la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (**Voltage Clamp**). El protocolo de pulsos de voltaje para registrar el curso temporal de las corrientes iónicas consistió de 12 pulsos que fueron en incrementos de 20 mV desde voltajes hiperpolarizantes (-160 mV) a voltajes despolarizantes (+60 mV). La duración de cada pulso fue de 100 ms y el potencial de mantenimiento se fijó en 0 mV (**Figura 2B**).

Una solución alta en K⁺ (118 mM) se utilizó como medio de registro (condiciones simétricas de K⁺). En este medio, el potencial de equilibrio del K⁺ (E_K) es 0 mV (**ecuación 15.1**). De esta manera, en potenciales de membrana hiperpolarizantes se facilitó el flujo entrante de K⁺ por un gradiente eléctrico a través de los canales Kir expresados en los ovocitos

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} = 25.26 \text{ mV} \ln \frac{118 \text{ mM}}{118 \text{ mM}} = 0 \text{ mV} \quad \dots\dots\dots (15.1)$$

Cuando la concentración de K⁺ en ambos lados de la membrana es igual, los canales de K⁺ rectificadores entrantes permiten el movimiento de los iones K⁺ hacia el interior de la célula a valores de potencial de membrana por de bajo del E_K., y prácticamente no permiten que los iones de K⁺ salgan de la célula [Kubo, *et al.* 1993; Nichols and Lopatin, 1997].

Los pulsos despolarizantes no se llevaron más allá de +60 mV porque hay una corriente endógena de cloro dependientes de Ca²⁺ (ICl-Ca) que se activa a potenciales de membrana despolarizantes (+40 a +100 mV) en una solución Ringer [Martínez, *et al.* 1999; Machaca y Hartzell, 1998]. Bauer y colaboradores (1996) demostraron que los canales de Cl⁻ activados por hiperpolarización están activos bajo una serie de potenciales hiperpolarizantes (-80 a -140 mV). Estas corrientes de aniones cloruro alcanzan 0.24 μA en una solución Ringer [Kowdley, *et al.* 1994].

Para prevenir la activación de los canales ICl-Ca en un medio alto en K⁺ (KCl 118 mM) no se aplicaron potenciales más despolarizantes de +60 mV en este trabajo.

15.2.1. Relación corriente-tiempo

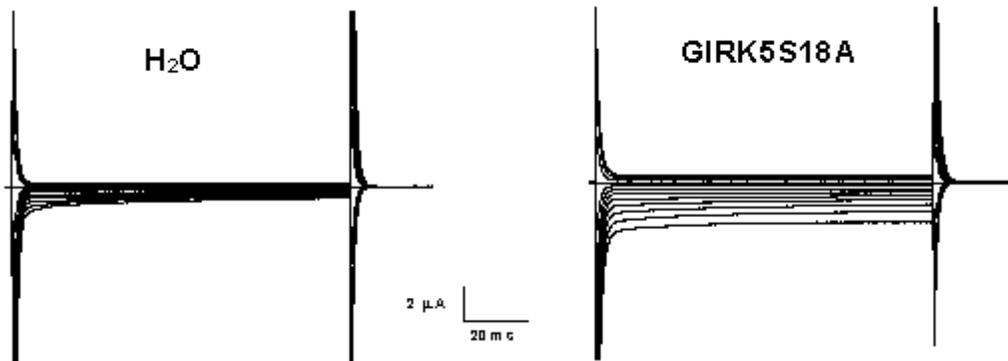
Bajo las condiciones experimentales mencionadas se registró el curso temporal de las corrientes rectificadoras entrantes de los canales GIRK5 y sus mutantes, puesto que, el curso temporal de las corrientes se observa siempre a potenciales de membrana por debajo del E_K . Los registros de la **figura 2A** muestran un ejemplo representativo del curso temporal o relación corriente vs tiempo. En los registros de los ovocitos control y de los ovocitos inyectados con RNAm de los canales mutantes se pueden apreciar los trazos de la corriente rectificadora entrante que se originó desde el potencial de mantenimiento (0 mV) como respuesta a una serie de pulsos de voltaje. El potencial de mantenimiento tiene el valor del potencial de equilibrio del ión K^+ (E_K).

15.2.2. Relación corriente – voltaje (I-V)

En las **figuras 2, 4 y 5C** se graficó la corriente como una función del voltaje, con la corriente en las ordenadas y el voltaje en las abscisas.

Para crear la curva I-V se utilizaron las corrientes registradas a los 80 ms de iniciados los pulsos de voltaje los cuales fueron de -160 mV a +60 mV. Las corrientes fueron tomadas de las relaciones corriente vs tiempo del control y de los canales mutantes (**Figuras 2, 4 y 5A**). Las corrientes fueron obtenidas desde un potencial de mantenimiento de 0 mV con el protocolo de pulsos que se muestra en la **figura 2B**. En la curva I-V (**Figura 2C**) se puede notar que tanto el canal endógeno GIRK5 (control) como los canales mutantes presentaron corrientes entrantes registradas a potenciales de membrana más hiperpolarizantes con respecto al $E_K = 0$, y solo se observan corrientes salientes mínimas a voltajes despolarizantes con respecto a E_K . Por lo tanto, los canales GIRK5 son buenos rectificadores ya que se observa una corriente saliente mínima.

A) Relación corriente-tiempo



B) Protocolo de pulsos



C) Relación corriente - voltaje (I-V)

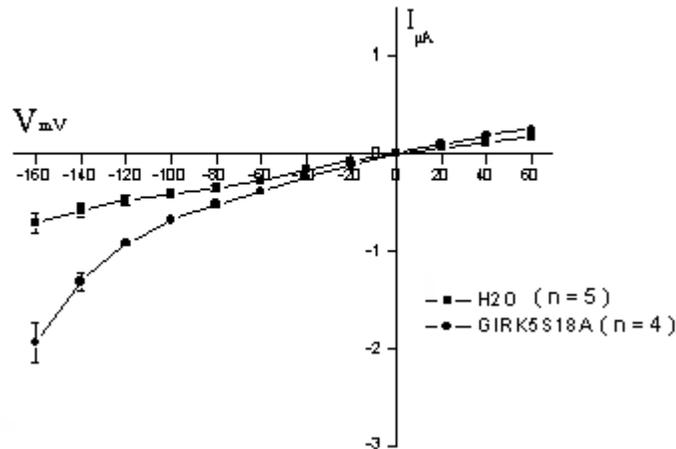


Figura 2. Expresión de los canales GIRK5S18A. A) Registros de las corrientes macroscópicas en los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRKQ20A. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. B) Protocolo de pulsos. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺. C) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n). La amplitud de las corrientes se midió a -160 mV.

15.2.3. Rectificación de los canales GIRK5.

Los canales GIRK5 recombinantes producen corrientes de K^+ con propiedades electrofisiológicas características de una rectificación entrante. En la curva I-V (**Figura 2C**) se puede advertir que la relación entre la corriente y el voltaje no fue lineal sino que rectifica o cambia de pendiente por arriba del potencial de equilibrio para el ión K^+ , es decir, no siguen la Ley de Ohm ya que a partir de los 0 mV la conductancia iónica de la membrana del ovocito fue mínima. Esta relación I-V muestra una característica de un canal de K^+ rectificador entrante: la conductancia asimétrica de iones K^+ , ya que, se registró una extensa corriente entrante a voltajes en los que el potencial de membrana fue más hiperolarizante (-160 mV a -20 mV) que el valor del potencial de mantenimiento (0 mV) y en potenciales despolarizantes se registraron pequeñas corrientes salientes.

El decremento del flujo de corriente de K^+ saliente o rectificación, se debe al bloqueo intracelular de Mg^{2+} y a las poliaminas. Cuando el potencial de membrana se hace más despolarizante aumenta la afinidad de los canales rectificadores entrantes por el Mg^{2+} y las poliaminas intracelulares [Nichols and Lopatin, 1997].

A partir de las curvas I-V se obtuvo el valor del potencial de reversión de la corriente rectificadora entrante cerca de 0 mV al utilizar concentraciones simétricas de K^+ (118 mM). El potencial de reversión (V_{rev}) de un ión es aquel valor del potencial en el cual la corriente invierte su polaridad, entonces, V_{rev} llega a ser igual al potencial de equilibrio para el ión en particular [Johnston y Miao-Sin Wo, 1995, Molleman, 2002]. En la **figura 2C** se puede observar que V_{rev} es de aproximadamente 0 mV, así, $V_{rev} = E_k = 0$ mV. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado en la tesis Doctoral de la Dra. Ivonne Mora, donde los ovocitos que expresaron los canales $\Delta 25$ GIRK5 en soluciones con alto K^+ (118 mM), el potencial de inversión de la corriente entrante fue de 0 mV y en una solución baja en K^+ (20 mM) fue de -40 mV (**Figura 3, datos no publicados**).

La solución alta en K^+ (118 mM) se utilizó para el registro ya que en los canales Kir al aumentar la concentración de K^+ externo la amplitud de la corriente de los canales aumenta [Salvador, *et al.* 2003], además de que el potencial de inversión de la corriente se desplaza a voltajes positivos con relación al potencial de equilibrio para el ión K^+ [Hagiwara y Yoshii, 1979, Lu, 2004].

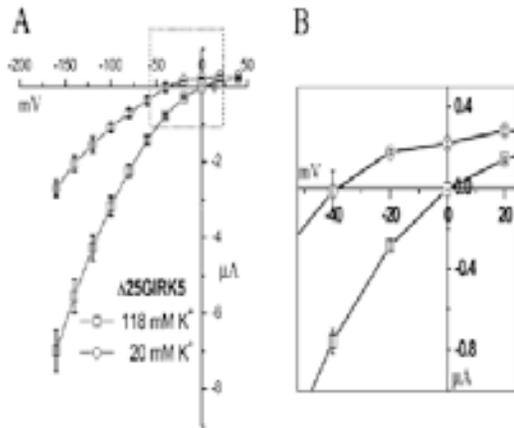
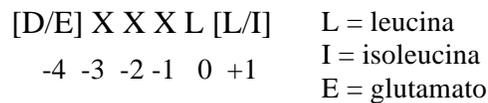


Figura 3. Efecto de la concentración de K⁺ externo en el canal Δ25GIRK5. A) Curva I-V de los ovocitos inyectados con ARNm del canal Δ25GIRK5. Se utilizaron dos diferentes concentraciones de K⁺ en la solución externa 118 y 20 mM. B) se observa la amplificación del recuadro marcado en A. [Tesis Doctoral de Ivonne Mora]

15.3. La mutación del residuo de serina (S18) de la secuencia ESPQLI promueve la expresión funcional del canal GIRK5.

De los canales mutantes GIRK5S18A, GIRK5P19A y GIRK5Q20A (**Figura 1B**), solo la mutación de S18A fue funcional (**Figura 2, 4 y 5 C**).

Esperábamos que los canales mutantes no fueran funcionales ya que las mutaciones puntuales de los aminoácidos del motivo [D/E]XXXL[L/I] en las posiciones -1, -2 y -3, se sabe no influyen en el impacto de la señal de internalización o localización polarizada en los receptores de membrana [Letourner y Klausner, 1992; Pond, *et al.* 1995; Sandoval, *et al.* 2000, Tabuchi, *et al.* 2002; Ho Koh, *et al.* 2005].



Por otra parte, la mutaciones en las posiciones 0, +1 y -4 por alanina, reducen drásticamente el tráfico de las proteínas de membrana a los endosomas o lisosomas, lo que resulta en su permanencia en la membrana plasmática [Letourner y Klausner, 1992; Pond, *et al.* 1995; Sandoval, *et al.* 2000; Tabuchi, *et al.* 2002; Rajasekaran, *et al.* 2003; Ho Koh, *et al.* 2005].

En el laboratorio de la Dra. Laura Escobar se encontró que las mutaciones de los aminoácidos glutamato (E17), leucina (L21) e isoleucina (I22) por alanina en esta secuencia señal de tráfico del canal GIRK5 eliminan su internalización, ya que se registran canales GIRK5 mutantes funcionales de K⁺: GIRK5E17A, GIRK5L21A y GIRK5I22A (datos no publicados). Estos resultados sugieren que la E17, L21 e I22 constituyen parte de

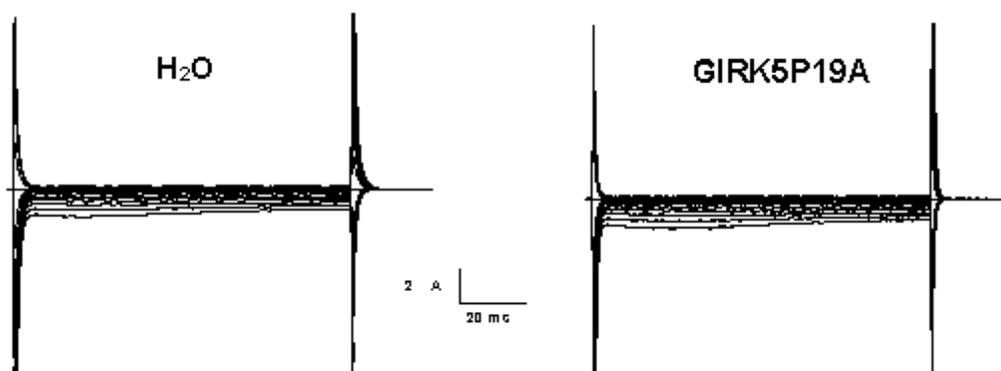
un motivo de internalización basado en dileucina. El diseño de los iniciadores para las construcciones E17A, L21a e I22A y el registro de los mismos en los ovocitos de *Xenopus laevis* fueron realizados por la Dra. Ivonne Mora.

Al registrar las corrientes se encontró que los canales mutantes GIRK5S18A expresan corrientes típicas rectificadoras entrantes (**Figura 2A y C**).

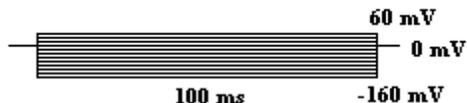
La corriente registrada a -160 mV en los ovocitos inyectados con el ARNm del canal GIRK5S18A muestra diferencias significativas comparado con los ovocitos control inyectados con agua $p < 0.01$ (**Figura 2C**). La corriente registrada en -160 mV en una solución de registro alta en K^+ (118 mM) fue de $0.71 \pm 0.10 \mu A$ (n=5) para los ovocitos inyectados con agua, y en los inyectados con el ARNm de los canales GIRK5S18A fue de $-1.93 \pm 0.20 \mu A$ (n=4) al cuarto día después de la inyección. En la relación I-V se pueden apreciar las diferencias en la magnitud de las corrientes (**Figura 2C**) del canal mutante GIRK5S18A y del canal endógeno GIRK5.

Cuando se expresó el canal GIRK5P19A (25 ng de ARN por ovocito) se registraron corrientes de $1.847 \pm 0.19 \mu A$ (n= 8, **Figura 4A y C**) que no mostraron diferencias significativas ($p > 0.01$) respecto a las corrientes registradas de los ovocitos control inyectados con agua que presentaron una corriente de $1.654 \pm 0.17 \mu A$ (n= 8).

A) Relación corriente-tiempo



B) Protocolo de pulsos



C) Relación corriente - voltaje (I-V)

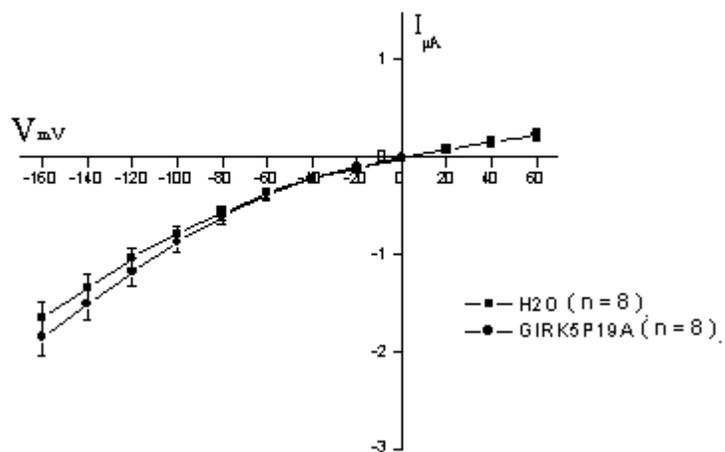
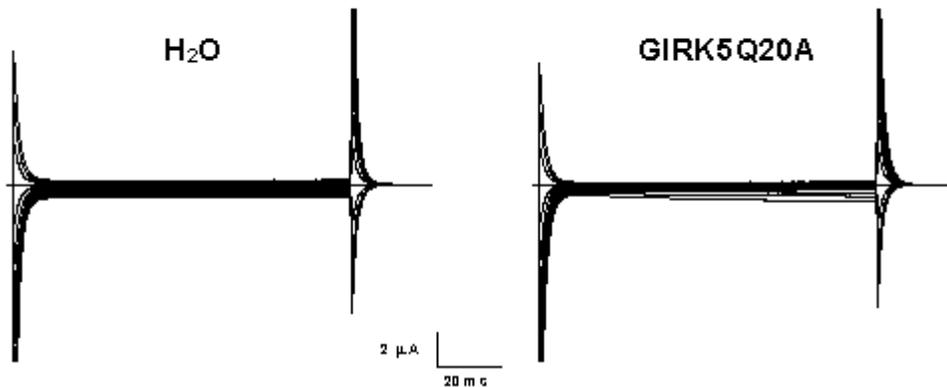


Figura 4. Expresión de los canales GIRK5P19A. A) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5P19A. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. B) Protocolo de pulsos. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺. C) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n). La amplitud de las corrientes se midió a -160 mV.

El registro funcional de los canales GIRK5Q20A no tiene diferencias significativas respecto a la corriente registrada en los ovocitos inyectados con 50 nl de H₂O, siendo éstas de $0.928 \pm 0.06 \mu\text{A}$ (n= 4) y, $0.653 \pm 0.04 \mu\text{A}$ (n=4) respectivamente ($p>0.01$ (Figura 5A y C)).

A) Relación corriente-tiempo



B) Protocolo de pulsos



C) Relación corriente - voltaje (I-V)

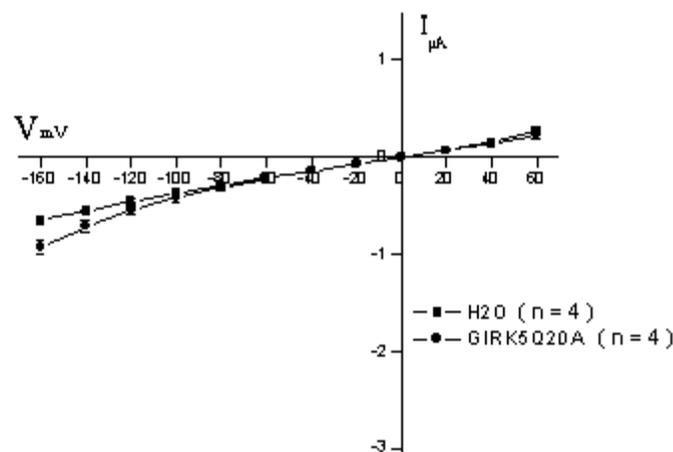


Figura 5. Expresión de los canales GIRK5Q20A. A) Registros de la corriente microscópica en los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRKQ20A. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. B) Protocolo de pulsos. Los registros se realizaron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺. C) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n).

Como se mencionó previamente, se utilizaron tres lotes de ovocitos provenientes de diferentes ranas en los que se observó que la amplitud de la corriente endógena de los ovocitos varió con respecto al lote de ovocitos utilizado (**Figura 2, 4 y 5 (A y C)**).

En particular el lote de ovocitos donde se registraron los canales mutantes GIRK5P19A se detectaron corrientes entrantes apreciables en los ovocitos control en los voltajes hiperpolarizantes. La amplitud de las corrientes entrantes provocadas por la hiperpolarización fueron mayores a $1.5 \mu\text{A}$ a un potencial de prueba de -160 mV en una solución de KCl (118 mM). Esta corriente endógena del canal silvestre se presentó en todos los ovocitos de un solo lote que provenía de una rana.

En contraste, los ovocitos inyectados con agua utilizados como control para los canales mutantes GIRK5S18A y GIRK5Q20A, y que fueron obtenidos de otras ranas, manifestaron corrientes rectificadoras entrantes mínimas a los voltajes hiperpolarizantes. La amplitud estas corrientes fueron menores a $0.8 \mu\text{A}$ en un potencial de prueba de -160 mV .

Los resultados obtenidos con ovocitos de diferentes ranas pueden mostrar una gran varianza. Es posible que el canal endógeno GIRK5 pueda ser medido fácilmente en un lote de ovocitos, pero puede no ser detectable en otro. Estas variaciones en el registro de las corrientes iónicas endógenas son observadas solo esporádicamente y pueden ser determinadas genéticamente [Weber W.-M., 1999a, b]. En conclusión, es evidente que la amplitud de la corriente endógena es variable para cada lote de ovocitos.

16. Discusión.

16.1. Análisis estadístico. Significancia estadística de los resultados.

En este trabajo se utilizaron tres lotes diferentes de ovocitos para la inyección del RNAm y, por ende, para el registro de los canales mutantes. El **grupo I** corresponde a los ovocitos inyectados con agua y el **grupo II** a los inyectados con el ARNm del canal respectivo.

La prueba t-student se eligió porque considera que, a pesar de que se desconocen la media y la variancia de las dos poblaciones, se puede suponer que éstas son las mismas en ambas y que además las poblaciones se distribuyen normalmente. La prueba t-student es una prueba paramétrica con la que se puede comparar la media entre dos muestras.

La relación entre las muestras es independiente, es decir, un grupo no depende del otro. Se utiliza cuando el tamaño de la muestra (n) es menor a 30 [Celis de la Rosa, 2004]. El nivel de significancia utilizado fue una $p < 0.01$ para asegurar que diferencias significativas entre los experimentos sea debida a la variabilidad biológica en un máximo del 1%. [Marques de Cantú, 1991, Celis de la Rosa, 2004].

16.1.2. Prueba t de student

Las dos poblaciones son:

- 1) Grupo I: ovocitos inyectados con H₂O. En este grupo el valor de las corrientes del canal "GIRK5" endógeno es variable pero no rebasa los 1.8 μ A al voltaje más hiperpolarizante aplicado (-160 mV).
- 2) Grupo II: ovocitos inyectados con el ARNm del canal mutado.

En todos los casos se utilizó el algoritmo siguiente:

A). Al nivel de significancia del $\alpha = 0.01$ se probaron las hipótesis siguientes:

H₀: $\mu_1 = \mu_2$ o la media de las corrientes registradas en ambas poblaciones serán iguales

H_a: $\mu_1 \neq \mu_2$ o la media de las corrientes registradas en ambas poblaciones serán diferentes.

Donde H₀ es la hipótesis nula y H_a es la hipótesis alternativa, μ_1 es la media de la corriente registrada en los ovocitos del grupo I, μ_2 es la media de la corriente registrada en los ovocitos del grupo II.

B). *Descripción de la población que interesa y planteamiento de las suposiciones necesarias:* Dos poblaciones que se distribuyen normalmente con una desviación estándar desconocida pero que se supone son iguales.

C. *Selección del estadístico:* Diferencia de las medias muestrales, $X_1 - X_2$

D). *Especificación del estadístico de prueba:* $t_{n_1 + n_2 - 2}$

Para $n_A \neq n_B$

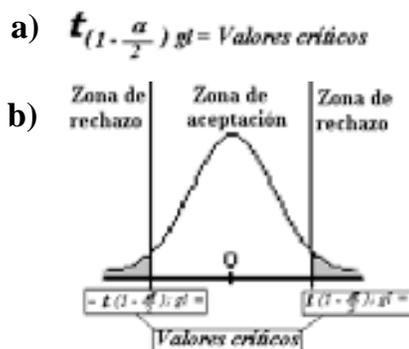
$$\text{Valor de } t \text{ calculado} = \frac{(X_1 - X_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}} \quad \text{en} \quad S_p^2 = \frac{s_1^2 (n_1 - 1) + s_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

y grados de libertad (gl) = $n_1 + n_2 - 2 =$

E). Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (H_0):

Obtener los **valores críticos** " $t_{(1-\alpha/2); g}$ " con la tabla de distribución t. $H_0: \mu_1 = \mu_2$ se trata de una prueba de dos colas (figura 2) y la región de rechazo se encuentra dividida en dos partes, una en cada extremo de la curva normal ($1-\alpha/2$)

Figura 6. a) Fórmula para obtener los valores críticos. b) Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2$). Las zonas son definidas por los valores críticos.



F). Tratamiento de los datos y cálculo de los estadísticos necesarios para obtener el valor de t calculado:

$\diamond Sp^2$ $\diamond t_{n_1 + n_2 - 2}$

G). Decisión estadística: Compara el valor t calculado mediante el estadístico de prueba con el valor crítico definido en el paso **E**).

▲ Si el valor de t calculado \geq al valor crítico, la media muestral se localizaría en la región de rechazo

▲ Si el valor de t calculado $<$ al valor crítico, la media muestral se localizaría en la región de aceptación.

Por tanto, cuando el valor de t calculado ($t_{n_1 + n_2 - 2}$) se encuentra en la región de aceptación se acepta la hipótesis nula, pero si se encuentra en la región de rechazo se rechaza H_0 .

H). Conclusión: Cuando se rechaza la H_0 se puede concluir que las poblaciones son estadísticamente diferentes. Cuando se acepta H_0 se concluye que las poblaciones pueden ser iguales, o que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

A continuación, se muestran los cálculos realizados para comparar las diferencias significativas entre las corrientes registradas a -160 mV en los diferentes experimentos.

16.1.2.1. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5S18A

En la **tabla 9** se muestra la estadística descriptiva de los datos obtenidos a partir del registro de las corrientes de los ovocitos inyectados con agua y de los inyectados con el ARNm del canal mutante GIRKS18A.

Tabla 9. Grupo I (1). Estadística descriptiva de los ovocitos inyectados con H2O. Grupo II (2). Estadística descriptiva de los ovocitos inyectados con el ARNm del canal mutante GIRK5S18A.

Grupo I (1)		Grupo II (2)	
Media (\bar{x})	0.712 μ A	Media (\bar{x})	1.936 μ A
Desv. Est.	0.220	Desv. Est.	0.418
n	5	n	4

A) Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (H_0):

Valores críticos: t ($1-\alpha/2$); $gl = 3.500$

a

$$gl = n_1 + n_2 - 2 = 5 + 4 - 2 =$$

$$\left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) = 1 - (0.001)/2 = \mathbf{0.995}$$

$$t \text{ (} 1-\alpha/2\text{); } gl = t \text{ 0.995, } 7=$$

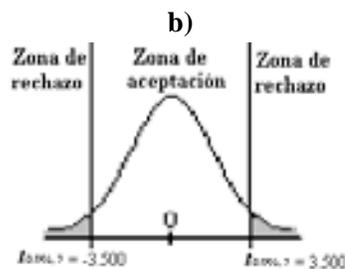


Figura 7. Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (H_0): a) cálculo de los valores críticos. b) Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2$)

B) Tratamiento de los datos y cálculo de los parámetros estadísticos.

Valor de t calculado

$$Sp^2 = \frac{(0.220)^2 (5-1) + (0.419)^2 (4-1)}{5 + 4 - 2} = 0.103$$

$$t_{n_1 + n_2 - 2} = \frac{0.712 - 1.933 - (\mu_A - \mu_B)}{\sqrt{\frac{(0.103)}{5} + \frac{(0.103)}{4}}} = \frac{1.223 - 0}{0.215} = 5.6845 \quad 45$$

C) *Decisión estadística:*

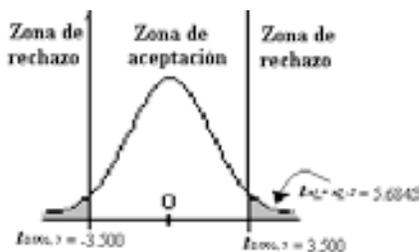


Figura 8. Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_A = \mu_B$).

El valor estadístico de prueba es $5.6845 > 3.500$, H_0 se rechaza con un valor de $\alpha = 0.01$.

Dado que el valor del estadístico de prueba “ $t_{n_1 + n_2 - 2}$ (calculado)” es 5.6845 y es mayor al valor del estadístico $t_{(1-\alpha/2); gl}$ reportado en las tablas es 3.500, el resultado encontrado entre los dos grupos estudiados se localiza en la región de rechazo de la hipótesis nula, por lo que ésta no se acepta al nivel de significancia del 1%.

E). *Conclusión*

Se concluye que, con base en las muestras estudiadas, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con agua (grupo I) y las corrientes registradas en los ovocitos que expresaron el canal mutante GIRK5S18A (grupo II) al nivel de significancia de 1% ($P < 0.01$). Por consiguiente, el canal GIRK5S18A es funcional.

16.1.2.2. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5P19A

En la **tabla 10** se muestra la estadística descriptiva de los datos obtenidos a partir del registro de las corrientes de los ovocitos inyectados con agua y de los inyectados con el ARNm del canal mutante GIRK5P19A.

Tabla 10. Grupo I (1). Estadística descriptiva de los ovocitos control inyectados con H2O. Grupo II (2). Estadística descriptiva de los ovocitos inyectados con el ARNm del canal mutante GIRK5P19A.

Grupo I (1)		Grupo II (2)	
Media (\bar{x})	1.654 μA	Media (\bar{x})	1.847 μA
Desv. Est.	0.482	Desv. Est.	0.564
n	8	n	8

A) Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (H_0):

Valores críticos: $t_{(1-\alpha/2); gl} = 2.977$

a)

$$gl = n_1 + n_2 - 2 = 8 + 8 - 2 =$$

$$\left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) = 1 - (0.001)/2 = 0.995$$

$$t_{(1-\alpha/2); gl} = t_{0.995, 14} =$$

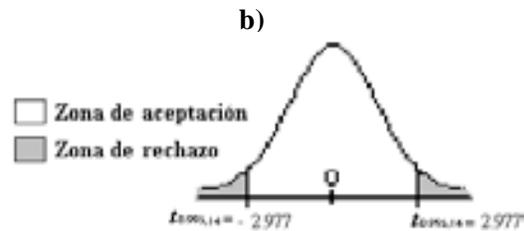


Figura 9. Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (H_0): a) cálculo de los valores críticos. b) Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) para $\alpha = 0.01$.

B) Tratamiento de los datos y cálculo de los estadísticos necesarios

Valor de t calculado

$$Sp^2 = \frac{(0.482)^2 (8-1) + (0.564)^2 (8-1)}{8 + 8 - 2} = 0.276$$

$$t_{n_1 + n_2 - 2} = \frac{1.654 - 1.847 - (\mu_A - \mu_B)}{\sqrt{\frac{(0.276)}{8} + \frac{(0.276)}{8}}} = \frac{0.193 - 0}{0.263} = 0.7351$$

C) La decisión estadística:

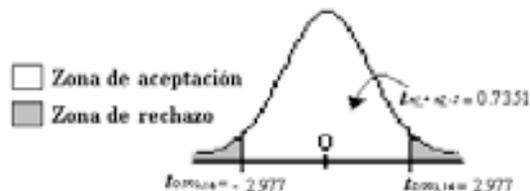


Figura 10. Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_A = \mu_B$).

El valor de estadístico de prueba es $0.7351 < 2.977$, H_0 se acepta con un valor de $\alpha = 0.01$.

Ya
que
el

valor de t calculado es menor (0.7351) que el valor crítico (2.977), se acepta la hipótesis nula al nivel de significancia del 1%. El resultado encontrado entre los dos grupos estudiados se localiza en la región de aceptación de la hipótesis nula.

I). Conclusión

Se concluye que, con base en las muestras estudiadas, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con agua (grupo I) y las corrientes registradas en los ovocitos inyectados al cuarto día con el canal mutante GIRK5P19A (grupo II) al nivel de significancia de 1% ($P > 0.01$).

16.1.2.3. Comparación entre dos medias: Canal GIRK5Q20A

En la **tabla 11** se muestra la estadística descriptiva de los datos obtenidos a partir del registro de las corrientes en los ovocitos inyectados con agua y en los inyectados con el ARNm del canal mutante GIRKQ20A.

Tabla 11. Grupo I (1). Estadística descriptiva de los ovocitos inyectados con H2O. Grupo II (2). Estadística descriptiva de los ovocitos inyectados con el ARNm del canal mutante GIRK5Q20A.

Grupo I (1)		Grupo II (2)	
Media (\bar{X})	0.653 μ A	Media (\bar{X})	0.831 μ A
Desv. Est.	0.043	Desv. Est.	0.121
n	4	n	4

C) Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (Ho):

Valores críticos: $t_{(1-\alpha/2); gl} = 3.707$

a)

$$gl = n_1 + n_2 - 2 = 4 + 4 - 2 =$$

$$(1 - \frac{\alpha}{2}) = 1 - (0.001)/2 = 0.995$$

$$t_{(1-\alpha/2); gl} = t_{0.995, 6} =$$

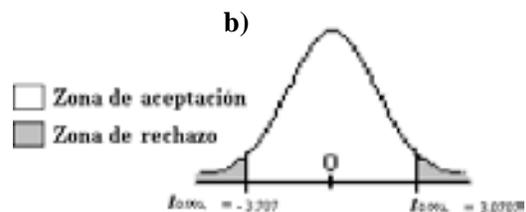


Figura 11. Especificación de las zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula (Ho): a) cálculo de los valores críticos. b) Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) para $\alpha = 0.01$.

D) Tratamiento de los datos y cálculo de los estadísticos necesarios.

Valor de t calculado

$$Sp^2 = \frac{(0.653)^2(4-1) + (0.831)^2(4-1)}{4 + 4 - 2} = 0.034$$

$$t_{n_1 + n_2 - 2} = \frac{0.653 - 0.831 - (\mu_A - \mu_B)}{\sqrt{\frac{(0.034)}{4} + \frac{(0.034)}{4}}} = \frac{0.178 - 0}{0.129} = 1.372$$

C) La decisión estadística:

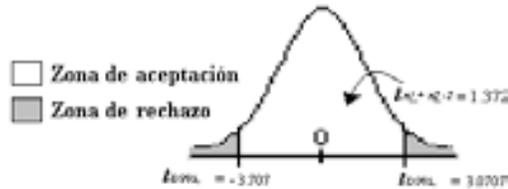


Figura 12. Zonas de rechazo y aceptación de la hipótesis nula ($H_0: \mu_A = \mu_B$).

El valor de estadístico de prueba es $1.372 < 3.707$, H_0 se acepta con un valor de $\alpha = 0.01$.

Ya

que

el valor de t calculado es menor (1.372) que el valor crítico (3.707), se acepta la hipótesis. El resultado encontrado entre los dos grupos estudiados se localiza en la región de aceptación de la hipótesis nula.

I). Conclusión

Se concluye que, con base en las muestras estudiadas, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con agua (grupo I) y las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con el canal mutante GIRK5Q20A (grupo II) al nivel de significancia de 1% ($P > 0.01$).

16.2. Posible función del residuo de serina S18 de la secuencia **ESPQLI** en el canal **GIRK5**.

Dado que los canales mutantes (GIRK5P19A y GIRK5Q20A) no son funcionales (**Figura 10 y 12**) y que el canal GIRK5S18A sí lo es (**Figura 8**), nuestros resultados confirman la hipótesis de que los aminoácidos P19 y Q20 no influyen en la actividad del motivo de **ESPQLI**. En contraste, la mutante **GIRK5S18A** sí es funcional y, por consiguiente, el motivo sería entonces **ESXXLI**. El hecho de que el residuo S18 está involucrado en la funcionalidad del canal GIRK5 nos sugiere también que la fosforilación de la serina podría ser el factor determinante de su función.

Se sabe que la región proximal de la proteína que comprende ~ 275 aminoácidos de los canales de K⁺ es responsable de las propiedades biofísicas del canal como son: la cinética de activación e inactivación [Flagg, *et al.* 2002]. En contraparte, las regiones dístales de la proteína (NH₂ y/o COOH terminales) están involucradas en las interacciones moleculares que afectan la localización celular y el tráfico de los canales [Ma, *et al.* 2002; Tanemoto, *et al.* 2002; Choen, *et al.* 1996]. Los estudios del tráfico de los canales Kir en los sistemas de expresión heterólogos, reportan señales que promueven la exportación de los canales desde el retículo endoplásmico: en el Kir1, VLSEVDETD, en el Kir2 y el Kir3 FCYENE [Ma, *et al.* 2001; Ma, *et al.* 2002]. Poco se sabe acerca del tráfico intracelular de los canales GIRK. Se ha observado que los canales GIRK2A y GIRK4 poseen señales localizadas en el NH₂-terminal que les permiten su salida del retículo endoplasmático: DQDVESPV y NQDMEIGV, respectivamente [Kennedy, *et al.* 1999]. Estos canales también muestran varios residuos ácidos que promueven su reclutamiento en la membrana plasmática. En el caso del GIRK2 el motivo de exportación es ELETEEEE y en el GIRK4 la secuencia es EAEKEAEAEHDEEEEPNG, ambos están en el carboxilo terminal [Ma, *et al.* 2002]. En el canal GIRK3 los aminoácidos tirosina, triptofano, serina e isoleucina (YWSI) localizados en la región C-terminal, forman una secuencia que es una señal de retención lisosomal del tipo YXXΦ [Ma, *et al.* 2002].

Del canal GIRK5 se conoce que sus niveles de expresión en la membrana plasmática están regulados por la desfosforilación de la Y16A en el NH₂ terminal [Mora y Escobar, 2005]. Justo la tirosina Y16 acota a la izquierda la señal de internalización del tipo dileucina “**ESPQLI**”. Al parecer este es el motivo mediante el cual el canal GIRK5 puede ser internalizado. Es importante subrayar que no existe en la literatura un caso en que una tirosina fosforilada retenga a una proteína de membrana ni que el motivo de internalización este acotado por una tirosina fosforilable. En el motivo del tipo dileucina [D/E]XXXL[L/I], X es cualquier aminoácido, por ende, cualquier aminoácido que ocupe esta posición no interviene en la función de la señal para internalizar o endocitar al canal GIRK5. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que los residuos de P19 y Q20 en el NH₂ terminal del canal GIRK5 forman parte de los residuos XX del motivo que no son relevantes: ESXXLI ya que su mutación no alteró la internalización del canal GIRK5.

Por otra parte, el hecho de que resultara funcional el canal mutante GIRK5S18A nos sugiere que la señal basada en di-leucina es más compleja, por lo cual, se proponen dos hipótesis:

Dado que la S18 se encuentra a su vez en la secuencia **KRLYES**PQLI pueden ocurrir dos posibilidades:

- un sitio de fosforilación del tipo **R/KXXXS*** para PKG [Kemp *et al.* 1977; Pearson, *et al.* 1991].
- Un sitio de fosforilación **KRXXS** para PKA [Kemp, *et al.* 1977; Kennelly y Krebs, 1991; Pearson, *et al.* 1991; Adams y Taylor, 1993; Shabb, 2001; Portela, *et al.* 2006; Neuberger, *et al.* 2007].

Y por tanto suponer que de alguna forma: la fosforilación de la S18 participa en el reconocimiento de la señal ESXXLI por el complejo adaptador (AP-2) para la internalización del canal GIRK5 [Dietrich, *et al.* 1994].

Aunque la secuencia consenso **KRXXS*** para ser reconocida por PKA no corresponde totalmente con la secuencia **KRLYES**S, ésta puede funcionar como un sustrato para PKA ya que el reconocimiento del sitio de fosforilación no depende estrictamente de una secuencia consenso precisa, además, esta proteína cinasa puede reconocer y fosforilar un rango extenso de sustratos relacionados. La presencia de aminoácidos básicos, particularmente arginina (R) en la posición P-2 y P-3 (relativo al residuo fosforilado en posición P0) son sustratos específicos para PKA, pero también pueden estar en las posiciones P-4 a P-7 [Kennelly y Krebs; 1991; Shabb, 2001; Neuberger, *et al.* 2007] que corresponde a la secuencia **KRLYES**S presente en el NH2-terminal del canal GIRK5

La fosforilación y la desfosforilación de los canales iónicos puede modificar su actividad y alterar las propiedades eléctricas de las células [Davis, *et al.* 2001]. Algunos canales iónicos son regulados por las proteínas cinasas A, C y G (PKA, PKC y PKG; respectivamente) que fosforilan residuos de serinas (S) y treoninas (T) [Lohmann, *et al.* 1997; Ruth, 1999].

Los canales GIRK también son el blanco de la PKA y PKC. Se ha observado que la PKA aumenta la corriente del heterotetramero GIRK1/GIRK4. Este aumento de la actividad en los canales GIRK es dependiente de las proteínas G $\beta\gamma$. Se ha sugerido que el papel de la PKA en los canales GIRK es la de facilitar la probabilidad de apertura de los canales

[Mullner *et al.* 2000]. El sitio específico de fosforilación no se ha identificado, pero se encontró que únicamente el canal GIRK1 es el que se fosforila en el heterotetramero GIRK1/GIRK4 [Medina *et al.* 2000]. Mientras que la acción de la PKA en los canales GIRK es la de aumentar la actividad de los canales mediada por proteínas G $\beta\gamma$, la PKC los inhibe [Takano *et al.* 1995, Hill y Peralta 2001, Mao *et al.* 2004]. La activación del receptor muscarínico m1 activa a su vez a la fosfolipasa C β lo que provoca la hidrólisis del PIP2 y la activación de la PKC [Hill y Peralta 2001]. La inhibición de la corriente de los canales GIRK por PKC se da a través de la fosforilación de una serina localizada en la región del carboxilo terminal, S185 en el canal GIRK1 y S191 en el canal GIRK4 [Mao *et al.* 2004]. A diferencia de PKA y PKC, no existe ninguna evidencia de que los canales GIRK sean modulados por PKG. Los canales de K⁺ activados por calcio (maxi-K) son activados por PKG [Robertson, *et al.* 1993; Stockand y Sansom, 1996] y por PKA [White, *et al.* 1995].

Posiblemente la fosforilación de la S18 por PKA o PKG está relacionada con la regulación del reconocimiento de la señal **ESPQLI** por el complejo adaptador (AP-2). La regulación por fosforilación puede ocurrir a través de la modificación de las proteínas de membrana adoptando un cambio de conformación. La fosforilación puede tener un efecto directo en la unión del motivo en las proteínas con el complejo AP-2 [Boll, *et al.* 1996; Pitcher, *et al.* 1999; Walunas, *et al.* 1994] o un efecto indirecto alterando la accesibilidad de los motivos a las proteínas adaptadoras [Cadena, *et al.* 1994]

La señal DKQTLL de la subunidad CD3 γ , la cual forma parte del receptor de la célula T (TCR; T Cell Receptor) (**Tabla 4**) es conocida por ser parte de una señal regulable por fosforilación SDKQTLL que media una rápida internalización de TCR en las células T [Dietrich, *et al.* 1994; von Essen, *et al.* 2002]. El receptor TCR posee un motivo del tipo dileucina mediante el cual TCR es internalizado desde la membrana plasmática vía vesículas recubiertas por clatrina después de la fosforilación del receptor por PKC [Shin, *et al.* 1991; Dietrich, *et al.* 1994; Letourner y Klausner, 1992; Pitcher, *et al.* 1999].

El motivo del tipo dileucina de la subunidad CD3 γ comprende nueve aminoácidos (RASDKQTLL) para la internalización de TCR inducida por PKC, este proceso puede ser descrita en dos pasos [Dietrich, *et al.* 1997].

El motivo del tipo dileucina en CD3 γ ha sido extensamente caracterizado, y

- 1) Un grupo (RxSxKQxxx) está involucrado en el primer paso llamado reconocimiento de CD3 γ como un sustrato para PKC con la sucesiva fosforilación de la S126. La fosforilación de S126 muy probablemente promovió un cambio conformacional de CD3 γ .
- 2) El segundo grupo (el xxxDxxxLL) participa en el reconocimiento y unión de CD3 γ fosforilado por el complejo AP-2 que como consecuencia lleva a la internalización del receptor TCR vía las vesículas recubiertas por clatrina.

Es posible que el reconocimiento del motivo **ESPQLI** en el canal GIRK5 por el complejo AP, tenga un tipo de regulación similar a la del receptor TCR mediante la fosforilación del residuo de serina18 presente en esa secuencia. Aun más, en algunos casos, otro residuo ácido o una serina fosfoaceptora antes del motivo D/E/S[D/E]XXXL[L/I] agrega fuerza a la señal [Bonifacino y Traub 2003]. Además de que los pares LL o LI, la unión de la señal al complejo AP2 es dependiente de los residuos ácidos en posiciones -5 y -4 a partir de la primer leucina [Dietrich, *et al.* 1994; Shin, *et al.* 1990 y 1991; Letourner y Klausner, 1992]. Aunque las interacciones selectivas entre el complejo AP-2 y los péptidos que contienen al motivo basado en dileucina han sido difíciles de demostrar. [Rapoport, *et al.* 1998], las mutaciones de la S126 por una ácido glutámico (E) en la subunidad CD3 γ mostraron una rápida velocidad de internalización del receptor TCR indicando que los efectos electrostáticos de la S126 fosforilada juegan un papel importante para el reconocimiento del motivo por las proteínas adaptadoras. [Dietrich, *et al.* 1997].

Esto soporta la idea de la regulación en el reconocimiento de la secuencia **ESPQLI** por el complejo AP-2, ya que la S18 fosforilada contiene dos cargas negativas aportadas por el grupo fosfato, además del residuo ácido (E) en la posición -4 y la tirosina fosforilada (Y) en la posición -5. Las cargas negativas de la S fosforilada en la posición -3 hace más fuerte la interacción entre el complejo AP-2 y el motivo **ESPQLI** del canal GIRK5. Se propone que en la mutante S18A el motivo de dileucina semejaría el estado no fosforilado de la S18 lo que hace poco eficiente el reconocimiento del canal GIRK5S18A por el complejo AP-2 para internalizarlo. En contraste, la fosforilación endógena o basal de la S18 induce un

cambio conformacional en el canal GIRK5 que hace que el motivo ESPQLI sea reconocido por la AP-2 y entonces, el canal GIRK5 se internalize.

Esto sugiere que la S18 fosforilada refuerza la eficacia de que el motivo EXXXLI sea reconocido por el complejo AP, por lo que disminuye el número de los canales GIRK5 en la membrana y lo mantiene internalizado; sin embargo, es necesario llevar a cabo los experimentos que permitan comprobarlo, por ejemplo: el uso de inhibidores de las PKA, PKC y PKG, así como su localización celular a través de las quimeras de las mutantes con el gene de la proteína verde fluorescente EGFP.

Los resultados revelan que la secuencia **ESPQLI** es una señal de endocitosis del tipo EXXXLI modificado a ESXXLI, , Se propone que la expresión funcional del canal GIRK5 en la membrana plasmática además de ser regulada por la fosforilación de la tirosina (Y16) por una PKT tipo Src [Mora y Escobar, 2005], también puede ser regulada por la fosforilación de la serina (S18) por la PKA o PKG.

17. Conclusiones.

- La mutación del residuo de serina (S18) de la secuencia **ESPQLI** promueve la expresión funcional del canal GIRK5.
- Las mutaciones de los residuos de aminoácidos P19 y Q20 no alteró la actividad del motivo de dileucina del tipo [D/E]XXXL[L/I] en el canal GIRK5.
- Los resultados revelan que la secuencia **ESPQLI** es una señal de endocitosis del tipo EXXXLI modificado a ESXXLI. Se propone que la expresión funcional del canal GIRK5 en la membrana plasmática además de ser regulada por la fosforilación de la tirosina (Y16) por una PKT tipo Src [Mora y Escobar, 2005], también puede ser regulada por la fosforilación de la serina (S18) por la PKA o PKG.

18. Perspectivas

Utilizar “**KT5720**” que es un inhibidor selectivo de PKA el cual se une a la subunidad catalítica de PKA y el inhibidor selectivo de PKG “**“Rp-8-Br-PET-cGMPS”**” para determinar el efecto en la actividad del canal GIRK5 e identificar que proteína cinasa es responsable de la fosforilación del residuo de serina 18 en el NH2 terminal del canal GIRK5.

19. Literatura citada.

- Aidley, D.J.** y Stanfield, P.R. (1998). Ion channels molecules in action, Cambridge University Press, U K. pp: 1-79.
- Alberts, B.**, Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K. & Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4^a. Ed. Garland science. USA. pp: 583-656
- Barish, M.E.** (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 342:309-25.
- Bauer, C.K.**, Falk, T. y Schwarz, J.R. (1996). An endogenous inactivating inward rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 432:812-20.
- Bello, V.**, Goding, J.W., Greengrass, V., Sali, A., Dubljevic, V., Lenoir, C., Trugnan, G., and Maurice, M. (2001). Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3004-3015.
- Bianchi, L.**, Roy, M.L., Tagliatalata, M., Lundgren, D.W., Brown, A.M. y Ficker, E. (1996). Regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL- 1 cells. *J. Biol. Chem.* 271:6114-6121.
- Bichet, D.**, Haass, F.A. y Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 957-67.
- Biggin, P.C.**, Roosild, T. y Choe, S. (2000). Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 456-61.
- Boll, W.**, Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L., Bonifacino, J., and Kirchhausen, T. (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP2 complexes. *EMBO J.* 15:5789-5795.
- Bond, C.T.**, Pessia, M., Xia, X.M., Lagrutta, A., Kavanaugh, M.P. y Adelman, J.P. (1994). Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels.* 2:183-91.
- Bonifacino, J. S.**, and Traub, L. M. (2003). Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395-447.
- Cadena, D.L.**, Chan, C.-L., and Gill, G.N. (1994). The tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor undergoes a conformational change upon autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269:260–265.
- Celis de la Rosa, A.** (2004). Bioestadística. Edit. Manual Moderno. 1^a. Ed. México, D. F. pp. 71-85.
- Choe, S.** (2002). Potassium channel structures. *Nature Rev. Neurosci.* 3:115-121.

- Cohen, N. A.**, Brenman, J. E., Snyder, S. H., Bredt, D. S. (1996). Binding of the inward rectifier K⁺ channel Kir2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron*. 17:759-767.
- Collins, B.M.**, McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*.109:523-535.
- Cunningham, B. C.** and Wells, J. A. (1989). High resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*. 244:1081-1085.
- Dascal, N.** (1997) Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell. Signal*. 9:551-73.
- Davis, M.J.**, Wu, X., Nurkiewicz, T.R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M.A. y Wilson, E. (2001). Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 281:H1835-62.
- Dietrich, J.**, Hou, X., Wegener, A. M., and Geisler, C. (1994). CD3γ contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J*. 13:2156-2166.
- Dietrich, J.**, Hou, X., Wegener, A. M., Pedersen, L. O., Odum, N., and Geisler, C. (1996). Molecular Characterization of the Di-leucine-based Internalization motif of the T cell receptor. *J. Biol. Chem*. 271:11441-11448.
- Dietrich, J.**, Kastrop, J., Nielsen, B. L., Odum, N., and Geisler, C. (1997). Regulation and Function of the CD3γ DXXXLL motif: A binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol*. 138:271-281.
- Dietzel, I. D.**, Bruns, D., Polder, H.-R. and Lux, H. D. in Kettenmann, H. and Grantyn, R. (Ed.), Practical Electrophysiological Methods, A John Wiley & Sons,INC., Publication. New York , 1993, pp 256-262.
- Doupnik, C.A.**, Davidson, N. y Lester, H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol*. 5:268-77.
- Doyle, D.A.**, Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. y MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280:69-77.
- Flagg, T.P.**, Yoo, D., Sciortino, C.M., Tate, M., Romero, M.F., Welling, P.A. (2002). Molecular mechanism of a COOH-terminal gating determinant in the ROMK channel revealed by a Bartter's disease mutation. *J. Physiol*. 544:351-362.
- Fraser, S: P.**, Moon, C and Djamgoz, M. B. A. in: Wallis, D. I. (Ed.), Electrophysiology, a Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, 1997, pp: 65-86.
- Gargos, J.**, Malone, L., France. A., Hinton, C., Eaton, D., (1990). *Gen. Physiol*. 96:45A-46A.

- Goldin A. L.** (1992). Maintenance of *Xenopus laevis* and Oocyte Injection. *Methods in Enzymology*. 207:266-279.
- Gong, Q.,** Weide, M., Huntsman, C., Xu, Z., Jan, L. Y., and Ma, D. (2007). Identification and Characterization of a New Class of Trafficking Motifs for Controlling Clathrin-independent Internalization and Recycling. *J. Biol. Chem.* 282:13087-13097.
- Griffiths, A. J.,** Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. y Gelbart, W.M. (2002). *Génetica*. 7^a. ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U. pp 403-434.
- Gurdon J,** Lane C, Woodland H. and. Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 233:177-182.
- Hagiwara, S. y Yoshida, M.** (1979). Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. *J. Physiol.* 292:251-65.
- He, M M.,** Wood, Z. A., Baase, W. A., Xiao, H. and Matthews, B. W. (2004). Alanine-scanning mutagenesis of the β -sheet region of phage T4 lysozyme suggests that tertiary context has a dominant effect on β -sheet formation. *Protein Science*. 13:2716-2724.
- Hedin, K.E.,** Lim, N.F., y Clapham, D.E. (1996). Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K^+ channel subunit that permits GIRK1 expression of I KACH currents in oocytes. *Neuron*. 16:423-29.
- Heilker, J.,** Manning-Krieg, U., Zuber, J. F., and Spiess, M. (1996). In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* 15:2893-2899.
- Hill, J.J. y Peralta, E.G.** (2001). Inhibition of a Gi-activated potassium channel (GIRK1/4) by the Gq-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 276:5505-10.
- Hille, B.** (2001). *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, Mass., USA. Pp: 2-4, 13-18, 131-160.
- Ho Koh, Y.,** von Arnim, C. A. F., Hyman, B. T., Tanzi, R. E., and Tesco, G. (2005). BACE Is Degraded via the Lysosomal Pathway. *J. Biol. Chem.* 280:32499-32504.
- Ho, K.,** Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M. V. y Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 362:31-8.
- Honing, S.,** Sandoval, I. V., and von Figura, K. (1998). A di-leucine- based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* 17:1304-1314.
- Huang, C.L.,** Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1997). Binding of the G protein subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K^+ channels. *FEBS Lett.* 405:291-8.

Huang, C.L., Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, N.Y. y Jan, L.Y. (1995). Evidence that direct binding of G to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron*. 15:1133-43.

Ismailov, I.I. y Benos, D.J. (1995). Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int*. 48:1167-79.

Jelacic, T.M., Sims, S.M. y Clapham, D.E. (1999). Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. *J. Membr. Biol.* 169:123-9.

Johnston, D. and Miao-Sin Wo, S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*, Mass., Institute of Technology. pp: 9-53, 121-214.

Karschin, C., Dissmann, E., Stuhmer, W. y Karschin, A. (1997) IRK(1–3) and GIRK(1–4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 16:3559-70.

Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E. and Krebs, E. G. (1977). Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252: 4888-4894

Kennedy, M.E., Nemeč, J., Corey, S., Wickman, K. y Clapham, D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-proteingated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274:2571-82.

Kennelly, P. J., and Krebs, E. G. (1997). Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266:15555–15558.

Kinlough, C.L., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L. y Hughey, R.P. (2004). MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J. Biol. Chem.* 279:53071-7.

Kirchhausen, T. (2002). Clathrin Adaptors Really Adapt. *Cell*. 109: 413–416.

Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. and Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation-receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin.. Cell. Biol.* 9: 488-495.

Kobayashi, T., Ikeda, K., Ichikawa, T., Abe, S., Togashi, S., and Kumanishi, T. (1995). Molecular cloning of a mouse G protein-activated K⁺ channel (mGirk1) and distinct distributions of three Girk (Girk1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:1166-1173.

Kofuji, P., Davidson, N. y Lester, H.A. (1995). Evidence that neuronal G protein gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by Gβγ subunits and function as heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6542-6.

Kowdley, G. C., Ackerman, J. S.; John, J. E.; Jones, L. R; and Moorman; J. R. (1994). Hyperpolarization-activated Chloride Currents in Xenopus Oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103:217-230.

- Krapivinsky, G.**, Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺ channel proteins. *Nature*. 374:135-41.
- Krapivinsky, G.**, Medina, I., Eng, L., Krapivinsky, L., Yang, Y. y Clapham, D.E. (1998a). A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron*. 20:995-1005.
- Kubo Y.** (1996). Effects of extracellular cations and mutations in the pore region on the inward rectifier K⁺ channel IRK. *Receptors and Channels*. 4:73-83.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J. Jan, Y. N. y Jan L. Y.** (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier K⁺ channel. *Nature*. 362:127-33.
- Le Borgne, R., and Hoflack, B.** (1998). Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin – coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:499-503.
- Letourneur, F., and Klausner, R. D.** (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine- based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*. 69:1143-1157.
- Liao, Y. J., Jan, Y. N., Jan, L.** (1996). Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in Weaver brain. *J. Neurosci.*16:7137-7150.
- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, S., Matsudana, P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2004). *Biología Celular y Molecular*. 5ª . ed. Editorial Medica Panamericana. México, D. F. Pp: 701-738.
- Loewi, O.** (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch*. 189:239-42.
- Lohmann, S.M.**, Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., and De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends. Biochem. Sci.* 22:307-312.
- Lopatin, A.N.**, Makhina, E.N. y Nichols, C.G: (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 372:366-9.
- Lu Z. y MacKinnon R.** (1994a). A conductance maximum observed in an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 104:477-86.
- Lu, L.**, Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.C. y Guggino, W.B. (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 57:1117-23.
- Lu, Z.** (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu. Rev. Physiol.* 66:103-29.
- Ma, D.**, Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*. 291:316-319.

- Ma, D.**, Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S.R., Jan, Y.N. y Jan LY. (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron*. 33:715-29.
- Machaca K. and Hartzell H. (1998) Asymmetrical Distribution of Ca-Activated Cl Channels in
- MacKinnon, R.** (2003). Potassium channels. *FEBS Lett*. 555:62-5.
- Mao, J.**, Wang, X., Chen, F., Wang, R., Rojas, A., Shi, Y., Piao, H. y Jiang C. (2004). Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101:1087-92.
- Mark, M.D. y Herlitze, S.** (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem*. 267:5830-6.
- Marques de Cantú, M. J.** (1991). Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas. 1ª. Ed. Edit. McGraw-Hill. México, D. F. pp. 235-306.
- Martínez, M.**, Salvador, C., Farias, M., Vaca, L., Escobar, L. (1999). Modulation of a calcium-activated chloride current by Maitotoxin. *Toxicon*. 37:359-370.
- Matsuda, H.** (1991). Effects of external and internal K⁺ ions on magnesium block of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea-pig heart cells. *J. Physiol*. 435:83-99.
- Matsuda, H.**, Saigusa, A. y Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by Mg²⁺. *Nature*. 325:156-9.
- Maxfield, F. R., and McGraw, T. E.** (2004). *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 121–132
- Miledi, R., I.** (1982). A calcium dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* 215:491-7.
- Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K.** (1983). Recording of single gamma-amino-butyrate-and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 218:481-484.
- Molleman, Areles.** (2003). Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. Jonh Wiley & Sons, LTD. pp: 5-42, 115-139
- Mora, S.I. y Escobar, L.I.** (2005). Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett*. 579:3019-23.
- Mousavi, S. A.**, Malerod, L., Berg, T., and Kjekken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 377:1-16
- Mullner, C.**, Vorobiov, D., Bera, A.K., Uezono, Y., Yakubovich, D., Frohnwieser- Steinecker, B., Dascal, N. y Schreibmayer, W.S. (2000). Heterologous facilitation of G protein-activated K⁺ channels by β -adrenergic stimulation via cAMP-dependent protein kinase. *J. Gen. Physiol.* 115:547-58.

- Muñoz – Martínez, E. J. y García, X.** (1998). Tomo I. Fisiología: Células, órganos y sistemas. IEPSA México, D. F. pp: 125-147.
- Nakatsu, F., Ohno, H.,** (2003). Adaptor Protein Complex as the key regulators of protein sorting in the Post-Golgi Network. *Cell Structure and Function*. 28:419-429
- Neer, E.J.** (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 80:249-57.
- Neuberger G., Schneider G., and Eisenhaber F.** (2007). pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biology Direct*. 2:1. Disponible en <http://www.biology-direct.com/content/2/1/1>.
- Nichols, C.G. y Lopatin, A.N.** (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol*. 59:171–91.
- Partiseti, M., Collura, V., Agnel, M., Culouscou, J.M. y Graham, D.** (1998). Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett*. 434:171-6.
- Pearson, R. B., and KEMP, B. E.**(1991). Protein Kinase Phosphorylation Site Sequences and Consensus Specificity Motifs: Tabulations. *Methods in Enzymology*. 200:62-81.
- Pearson, W. L., Skatchkov, S. N., Eaton, M. J., and Nichols, C. G.** (2006). C Terminal Determinants of Kir4.2 Channel Expression. *J. Membrane Biol*. 213:187-193.
- Penden, A. A., Park, G. Y., and Scheller, R. H.** (2001). The Di-leucine motif of vesicle-associated membrane protein 4 is required for its localization and AP-1 binding. *J. Biol. Chem*. 276:49183-49187.
- Pitcher, C., Honing, S., Fingerhut, A., Bowers, K., and Marsh, M.** (1999). Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell*. 10:677-691.
- Pocock, G., Richards, C., Masson.** (2005). Fisiología Humana. La base de la medicina. 2ª. ed. México, D. F. pp: 35-47.
- Pond, L., Kuhn, L., Teyton, L., Schutze, M.-P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., and Peterson, P.A.** (1995). A role for acidic residues in dileucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem*. 270:19989-19997.
- Portela, P., Moreno, S. and Rossi S.** (2006). Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein. *Biochem. J*. 396:117-126.
- Raffa, R. B.** (2002). Harmonic Mean Relationship between Affinity for wild-type Receptors and Alanine-scan mutants. *J. Theor. Biol*. 218:207-214.

- Rajasekaran, Sigrid A.,** Anilkumar G., Oshima E., Bowie, J. U., Liu, H., Heston, W., Bander, N. H., and Rajasekaran, A. K. (2003). A Novel Cytoplasmic Tail MXXXL Motif Mediates the Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen. *Molecular Biology of the Cell* ,14:4835-4845.
- Rapoport, I., Chen, Y. C.,** Cupers, P., Shoelson, S. E., and Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine- based motif-binding site. *EMBO J.* 17:2148-2155.
- Robertson, B. E.,** Schubert, R., Hescheler, J., and Nelson, M. T. (1993). cGMP dependent protein kinase activates cAMP kinase-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265:C299–C303.
- Ruth P.** (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinases: Understanding *in vivo* functions by gene targeting. *Pharmacol. Theor.* 82:355-372.
- Sadja, R.,** Alagem, N. y Reuveny, E. (2003). Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron.* 39:9-12.
- Salvador, C.,** Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G., and Escobar, L.I. (2001). Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:135–47.
- Salvador, C.,** Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. y Escobar LI. (2003). Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences.* 72:1509–18.
- Sandoval, I. V., and Bakke O.** (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends. Cell. Biol.* 4:292-297.
- Sandoval, I.V.,** Martinez-Arca, S., Valdueza, J., Palacios, S., and Holman, G.D. (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP2 and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 275:39874–39885.
- Shabb J. B.** (2001). Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem. Rev.* 101:2381-2411.
- Shin, J.,** Dunbrack, R. L., Lee, S., and Strominger J. L. (1991). Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4. *J. Biol. Chem.* 266:10658-10665.
- Shin, J.,** Doyle C., Yang, Z., Kappes D., and Strominger J. L. (1990). Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO J.* 9:425-434.
- Sigel, E. (1990).** Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membr. Biol.* 117:201-221.

- Signorini, S.,** Liao, Y.J., Duncan, S.A., Jan, L.Y., and Stoffel, M. (1997). Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:923-927.
- Sim, J.H.,** Yang, D.K., Kim, Y.C., Park, S.J., Kang, T.M., So, I. y Kim, K.W. (2002). ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in guinea pig gastric myocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G137-44.
- Smith, P.A.,** Sellers, L.A. y Humphrey, P.P. (2001). Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K⁺ channels in MIN-6 cells. *J. Physiol.* 532:127-42.
- Songyang Z,** Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwnica-Worms H, Cantley LC. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* 4:973-982.
- Soreq, H. and Seidman S.**(1992). Xenopus Oocyte Microinjection: From Gene to Protein. *Methods in Enzymology.* 207:225-265
- Stockand, J. D. and Sansom, S. C.** (1996). Mechanism of activation by cGMP dependent protein kinase of large Ca²⁺-activated K⁺ channels in mesangial cell. *Am. J. Physiol.* 271:C1669-C1677.
- Stockklauser, C. y Klöcker, N.** (2003). Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J. Biol. Chem.* 278:17000-5.
- Stühmer W.** (1992). Electrophysiological recording from Xenopus oocytes in Rudy B, Iverson L (eds). *Methods in Enzymology. Academic Press.* 207: 318-339.
- Tabuchi, N.,** Akasaki, K. and Tsuji, H. (2002). Ile (476), a constituent of di-leucine-based motif of a major lysosomal membrane protein, LGP85/LIMP II, is important for its proper distribution in late endosomes and lysosomes. *BBRC (Biochemical and Biophysical Research Communications)* 295:149–156.
- Tabuchi, N.,** Akasaki, K. and Tsuji, H. (2002). Ile (476), a constituent of di-leucine based motif of a major lysosomal membrane protein, LGP85/LIMP II, is important for its proper distribution in late endosomes and lysosomes. *BBRC (Biochemical and Biophysical Research Communications)* 295:149–156.
- Takano, K.,** Stanfield, P.R., Nakajima, S. y Nakajima, Y. (1995). Protein kinase C mediated inhibition of an inward rectifier potassium channel by substance P in nucleus basalis neurons. *Neuron.* 14:999-1008.
- Tanemoto, M.,** Fujita, A., Higashi, K. y Kurachi, Y. (2002). PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron.* 34:387-97.
- Tang, W.,** Qin, C.L. y Yang XC. (1995). Cloning, localization, and functional expression of a human brain inward rectifier potassium channel (hIRK1). *Receptors Channels.* 3:175-83.

- Tarasov, A.**, Dusonchet, J. y Ashcroft, F. (2004). Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes*. 53:S113-22.
- Tiran, Z.**, Peretz, A., Attali, B. y Elson, A. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of Kv2.1 Channel activity at tyrosine 124 by Src and by proteintyrosine phosphatase epsilon. *J. Biol. Chem.* 278:17509-14.
- Trowbridge, I. S.**, Collawn, J. F., and Hopkins. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Biol.*9: 129-161.
- Tzounopoulos, T.**, Maylie, J. and Adelman, J.P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 69:904-908.
- van Vliet, C.**, Thomasb, E. C., Merino-Trigoa A., Teasdaleb, R., D., and Gleesona, P. A. (2003). Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 83:1-45.
- von Essen, M.**, Menne, C., Nielsen, B.L., Lauritsen, J.P., Dietrich, J., Andersen, P.S., Karjalainen, K., Odum, N., and Geisler, C. (2002). The CD3 gamma leucine based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down regulation. *J. Immunol.* 168:4519– 4523.
- Walunas, T.L.**, Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T-cell activation. *Immunity*. 1:405–413.
- Weber, W.-M.** (1999a). Endogenous Ion Channels in oocytes of *Xenopus laevis*: Recent Developmens. *J. Membrane Biol.* 170:1-12.
- Weber, W.-M.** (1999b). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta.* 1421:213-233.
- Werner, P.**, Hussy, N., Buell, G., Jones, K. A., and North, R. A. (1996). D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 49:656–61.
- Wettschureck, N. y Offermanns S.** (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific function. *Physiol Rev.* 85:1159-204.
- White, R. E.**, Darkow, D. J., and Lang, J. L. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ. Res.* 77:936-942.
- Wickman, K., and Clapham, D.E.** (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* 75:865–885.
- Xenopus* Oocytes. *Biophysical Journal.* 4:1286-1295.
- Yamada, M.**, Inanobe, A. y Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* 50:723-60.