



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LOS MOTIVOS DE TRÁFICO DEL CANAL ENDÓGENO
GIRK5, EN LOS OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

BEATRIZ DÍAZ BELLO

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ernesto Maldonado Olvera
[Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM](#)
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad de México, abril 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutor, por asesorar el desarrollo de esta tesis:

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez (dirección de tesis)
Dr. Ernesto Maldonado Olvera
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

A los miembros del jurado para el examen de grado, por sus valiosas observaciones para corregir este trabajo:

PRESIDENTE: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
VOCAL: Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
VOCAL: Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
VOCAL: Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas
SECRETARIO: Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Por su apoyo técnico:

M. en C. Carolina Salvador Hernández
Dr. Rolando Carrisoza Gaytán

Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en el laboratorio de Canales Iónicos (lab. 510), del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este proyecto fue apoyado por los donativos **IN224406** e **IN202110** de la Dirección General de Estudios de Posgrado (**DGAPA**), por el donativo no. **166913** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) y por la beca para estudios de doctorado otorgada por **CONACyT**, de febrero de 2009 a enero de 2013, con el número de **becario 207419**. Gracias al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (**PAEP**) por el financiamiento parcial para asistir a un **congreso internacional** (España, 2009) y a un **curso de especialización** en el CSHL (EUA, 2012).

Un agradecimiento especial a todas las personas que con su trabajo y aportaciones permiten la educación pública en este país; a todos los que me ayudaron personalmente con su trabajo o apoyo moral durante la realización y, sobre todo, la culminación de este proyecto.

A mis padres (y a mi hermana)

Por enseñarme que uno puede superarse a sí mismo las veces que quiera y que la dificultad o improbabilidad de lograr algo no es un criterio para no intentar. Por mostrarme la importancia de la educación en la vida de las personas, que puede cambiarlo todo, pero que la inteligencia es nada sin esfuerzo. También por su motivación inagotable y el consejo pertinente; por compartir conmigo lo que saben del mundo y enseñarme que se puede cuestionar lo que se ha dado por sentado.

Gracias.

Índice	Pág.
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
<i>Abstract</i>	9
1. Introducción.....	10
1.1 Canales iónicos.....	11
1.1.1 Canales de potasio (K^+)	13
1.1.2 Canales de K^+ rectificadores entrantes (Kir)	15
1.1.3 La Subfamilia Kir3.x (GIRK) activada por el dímero $G\beta\gamma$	17
1.2 Localización intracelular de proteínas.....	23
1.2.1 Vías de tráfico intracelular	23
1.2.2 Motivos de localización intracelular	26
1.2.3 Reconocimiento de los motivos en el tráfico vesicular	29
1.2.4 Motivos de localización endosomal-lisosomal y basolateral	34
1.3 El ovocito de <i>Xenopus laevis</i> , una célula polarizada.....	38
2. Antecedentes.....	43
3. Justificación.....	51
4. Hipótesis y objetivos.....	53
5. Metodología.....	56
<i>Descripción de métodos</i>	
Mutaciones puntuales del canal GIRK5.....	58
Diseño de oligonucleótidos	59
Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR	59
Ligación	59
Transformación bacteriana	60
Amplificación del ADNc <i>in vivo</i>	60
Subclonación de un marcador fluorescente para RE	60
Obtención del ARNm	60
Obtención de los ovocitos	61
Microinyección de los ovocitos	62
Cortes citológicos.....	62
Microscopía confocal	62
Cuantificación de fluorescencia	63
Maduración <i>in vitro</i>	63
Western-blot	63

6. Resultados y discusión.....	65
6.1 Localización del retículo endoplásmico en el polo animal de los ovocitos de <i>X. laevis</i>	66
6.2 Localización del canal GIRK5-WT en el retículo endoplásmico y espacio perinuclear de los ovocitos de <i>X. laevis</i>	71
6.3 Identificación de un motivo dibásico que participa en la retención del canal en el RE	75
6.4 Identificación de un motivo de dileucina que participa en la localización polarizada del GIRK5-Y16A	84
6.5 Localización polarizada del canal renal ROMK1 en ovocitos de <i>X. laevis</i>	92
6.6 Localización del canal GIRK5 en ovocitos maduros (metafase II)	94
7. Conclusiones y perspectivas.....	108
Conclusiones	109
Perspectivas	111
8. Referencias.....	112
I. Apéndice.....	125
i Formulación de soluciones	126
ii Mutagénesis dirigida	128
iii Reacción de ligación	130
iv Obtención de las mutaciones del canal GIRK5	131
v Subclonación del marcador fluorescente de retículo endoplásmico	135
vi Secuenciación automatizada de las mutaciones realizadas	136
vi Artículos publicados	138

Abreviaturas

Å	Angstrom.
14-3-3	Proteína reguladora que participa en la transducción de señales.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
AG	Aparato de Golgi.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero.
CGN	cis-Golgi Network (Red del cis-Golgi).
COP	Coatamer Protein (Proteína coatómero).
E	ácido glutámico.
ERGIC	Endoplasmic reticulum – Golgi intermediate compartment (Compartimento intermedio entre el Retículo endoplásmico y el aparato de Golgi).
GGA	Golgi-localised, γ ear containing, ARF-binding proteins.
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante, activado por proteínas $G\beta\gamma$.
GTP	Guanosine-5'-triphosphate (Guanosina-5'-trifosfato).
GTPasa	Enzima con actividad de hidrólisis de GTP.
$G\beta\gamma$	Subunidad beta-gamma de las proteínas G heterotriméricas.
I	isoleucina.
K	lisina.
K^+	ion potasio.
Kir	Canal de potasio rectificador entrante.
L	leucina.
μm	micrómetro.
mV	milivolts.
nA	nanoamperios.
Na^+	ion sodio.
R	arginina.
RE	Retículo endoplásmico.

TM	segmento transmembrana de una proteína integral.
TNG	trans-Golgi Network/ Red del trans-Golgi.
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> .
Y	tirosina.

RESUMEN

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* son células asimétricas con dos polos. Estos ovocitos presentan el canal iónico endógeno denominado GIRK5. Los canales GIRK son canales de potasio rectificadores entrantes, que se activan por las subunidades beta-gamma de las proteínas G heterotriméricas. Los primeros 25 aminoácidos del canal GIRK5 son relevantes para regular su localización y su expresión funcional. El canal GIRK5-WT se ubica intracelularmente; el canal sin los primeros 25 aminoácidos se distribuye por todo el ovocito y la mutación del residuo de tirosina 16 por alanina origina canales con una localización preferente en el polo vegetal.

La localización intracelular de proteínas está regulada por secuencias de aminoácidos. A pesar de que el ovocito es un modelo muy utilizado para la expresión de proteínas, no se ha identificado plenamente si en los ovocitos de *Xenopus* se reconocen estas señales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los motivos que pudieran originar la retención del canal GIRK5-WT y la polarización de GIRK5-Y16 en los ovocitos. Además, dado que la expresión de canales GIRK5 funcionales favorece la maduración de los ovocitos, se determinó si su localización se mantenía una vez que los ovocitos hubieran salido del estadio VI.

Se realizó la mutación puntual de una secuencia dibásica y de un motivo de dileucina en el canal GIRK5, y se expresaron en los ovocitos como proteínas quiméricas con EGFP. Se utilizó un marcador fluorescente para identificar el retículo endoplásmico (con un motivo del tipo KDEL). Se optimizó una técnica para realizar cortes citológicos de 10 micras por congelación y se observaron por microscopía confocal.

Se logró determinar que el motivo KRXY estaba relacionado con la retención del canal en el RE del ovocito de *X. laevis* y que el motivo YEXXXLI participaba en la localización del canal hacia el polo vegetal. Además, la localización de los canales GIRK5-WT y GIRK5-Y16A cambió entre ovocitos retenidos en estadio VI y ovocitos maduros.

Se pudo comprobar que en el ovocito de *X. laevis* la localización de proteínas puede depender de las secuencias de aminoácidos que posea y estos motivos pueden ser compartidos con los que se presentan en otros tipos celulares. Además, el cambio de localización cuando los ovocitos maduran (GVBD) apoya la idea de que el canal participa en esa etapa de los ovocitos.

ABSTRACT

The *Xenopus laevis* oocytes are asymmetrical cells with two poles. These oocytes present the endogenous ion channel called GIRK5. GIRK channels are inwardly rectifying potassium channels, activated by the beta-gamma subunits of heterotrimeric G proteins. The first 25 amino acids of GIRK5 are relevant to regulate its location and functional expression. The GIRK5-WT channel is located intracellularly; the channel without the first 25 amino acids is distributed throughout the oocyte and the tyrosine 16 residue mutation to alanine causes a major location in the vegetal pole.

The intracellular localization of proteins is regulated by amino acid sequences. Although the oocyte is a widely used model for protein expression, it has not been fully identified if these signals are recognized in *Xenopus* oocytes. The aim of this study was to characterize the motifs that may cause retention of GIRK5-WT channel and polarization of GIRK5-Y16 in the oocytes. Furthermore, the expression of functional GIRK5 channels promotes oocyte maturation in an unknown manner so far, then the location once oocytes has left the stage VI was observed.

Punctual mutations of a dibasic sequence and a dileucine motif in the GIRK5 channel were performed in the GIRK5 channel, those were expressed as chimeric proteins with EGFP in the oocytes. A fluorescent marker was used for ER (with a KDEL motif). A technique for cryostat-cut 10microns slices was optimized and slices were observed by confocal microscopy.

It was determined that the KRXY motif was related with the ER channel retention and the YEXXXLI motif involved in the localization of the channel to the vegetal pole. In addition, the location of the GIRK5-WT and GIRK5-Y16A channels changed between stage VI and mature oocytes.

It was also proved that in the *X. laevis* oocyte the protein localization may depend of the amino acid sequences, and these motifs can be shared with those observed in other cell types. Moreover, the change of location in mature oocytes (GVBD) supports the idea that the GIRK5 channel is involved in the oocytes maturation.

1. Introducción

1.1 Canales iónicos

Las células de los organismos están rodeadas por membranas biológicas; su función es separar y regular la composición de dos medios de distinta composición, el medio extracelular e intracelular [Hille 2001]. La membrana celular está compuesta por una bicapa lipídica anfipática y por proteínas integrales de membrana responsables de la entrada o salida de metabolitos específicos, para permitir el control de la composición celular. La membrana lipídica de los organelos es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrofílicas. Ciertas proteínas transmembranales permiten el transporte, de pequeñas moléculas orgánicas hidrosolubles o de iones inorgánicos, a través de la bicapa. Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de los iones hacia el exterior o el interior celular; su selectividad iónica y la regulación de su apertura las diferencian de los simples poros acuosos.

La selectividad iónica se refiere a la capacidad de discriminación entre los distintos iones; sin la selectividad, la generación de las señales eléctricas en los sistemas biológicos sería imposible. Cada canal iónico permite el transporte preferente de un tipo de ion: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), o cloro (Cl^-) [Hille, 2001]. Los iones pasan a través de la parte más estrecha de los canales, donde se forma un poro con un *filtro de selectividad*, y esto regula su velocidad de paso. El flujo a través de los canales tiene una velocidad de 10^7 - 10^8 iones por segundo [Hille, 2001], muy superior a la de los transportadores (10^3 iones/s) [Tamargo, 2004] y bombas (10^2 iones/s) [Goaux & MacKinnon, 2005].

La apertura del poro ocurre en respuesta a un estímulo específico. Los principales tipos de estímulos son: cambios en el voltaje a través de la membrana (*canales regulados por voltaje*), un estrés mecánico (*canales regulados mecánicamente*) o la unión de un ligando (*canales regulados por ligando*). El ligando puede ser un mediador extracelular de receptores ligados a enzimas (*canales regulados por fosforilación*), o actuar específicamente como un neurotransmisor (*canales regulados por transmisor*), puede ser un mediador intracelular como un ion (*canales regulador por iones*) o un nucleótido (*canales regulados por nucleótidos*) [Hille, 2001; Alberts *et al*, 2004].

En cuanto a su estructura, los canales iónicos están formados por unidades proteicas del mismo tipo o subfamilia (subunidad alfa). Cada subunidad contiene varios segmentos transmembranales, más una región que forma el poro (Fig. 1.1). En algunos casos, la subunidad alfa se asocia con otras subunidades auxiliares - en el citoplasma - que pueden modular tanto la apertura como la inactivación o la expresión en la superficie celular (subunidades beta) [Adiley & Stanfield, 1996; Shi *et al*, 1996; Bigging *et al*, 2000].

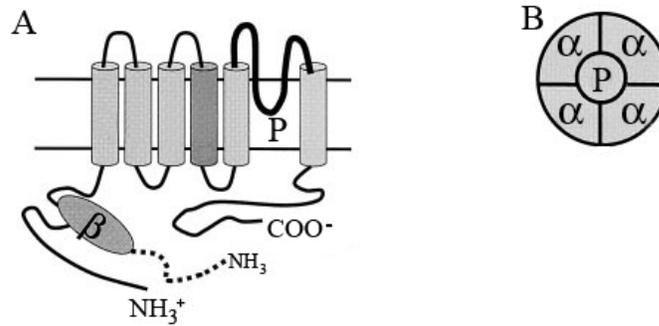


Figura 1.1 Representación esquemática de las subunidades de un canal iónico.

A) Subunidad alfa de un canal de potasio dependiente de voltaje, con seis segmentos transmembranales, una región que forma el poro (P) y una subunidad beta en el amino terminal. B) Canal iónico tetramérico, compuesto por cuatro subunidades alfa que forman el poro de conducción iónica (P) [modificado de Shieh *et al.*, 2000].

Los canales iónicos tienen papeles fundamentales en el funcionamiento de los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, y no son exclusivos de las células excitables (musculares, nerviosas y endócrinas [Poulsen, 1976]). En los procariotes, los canales iónicos son cruciales para la supervivencia y el crecimiento celular [Biggin *et al.*, 2000]. En el eucariote unicelular *Paramecium*, la distribución específica de canales permite redireccionar su movimiento cuando se encuentra con algún obstáculo [Mogami & Baba, 1998]. En las plantas están ampliamente distribuidos [Tester, 1989], son responsables de la propagación de respuestas para que ocurra el movimiento de las hojas rápido en *mimosa pudica* [Visnovitz, 2007; Volkov *et al.*, 2010, 2013]. En organismos superiores los canales iónicos son primordiales en la señalización celular, establecen el potencial de membrana en reposo, permiten la generación de impulsos eléctricos en las células excitables, el ritmo cardíaco, la liberación de neurotransmisores (que permite la transferencia de información en el sistema nervioso), la contracción muscular, la secreción hormonal al torrente sanguíneo y la regulación del volumen celular [Hille, 2001; Levitan & Kaczmarek, 2002].

1.1.1. Canales de potasio (K^+)

En el ser humano se han descrito, hasta la fecha, alrededor de 400 genes que codifican para canales iónicos, lo que corresponde a $\sim 1.5\%$ del genoma [Huang & Jan, 2014; Ezkurdia *et al*, HGNC¹, 2015]. Los canales de potasio son el tipo de canal iónico más abundante con 79 genes identificados [HGNC², 2015], están presentes tanto en células excitables como no excitables y tienen un papel crucial en el mantenimiento del potencial de reposo, de las membranas plasmáticas [Hille, 2001].

La evolución de los canales de K^+ no se ha determinado por completo; la amplia distribución de esta familia de canales a través de los organismos biológicos sugiere que son proteínas muy antiguas [Hille, 2001]. Con los genomas secuenciados de distintos organismos se determinó que los eucariotes, las bacterias y las arqueas tienen por lo menos un canal de K^+ [Littleton & Ganetzky, 2000; Miller, 2000]. No existe otro tipo de canal iónico que sea tan ubicuo en la naturaleza. Su amplia distribución en los vertebrados sugiere que se encuentran relacionados a la evolución de órganos complejos, cuya función requiere un control preciso de la excitabilidad de la membrana [Lovell *et al*, 2013].

Los canales de potasio participan en procesos fisiológicos diversos: en la función cardíaca, el control de la fase de re-polarización en las células excitables, la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, el transporte de electrolitos en epitelios, la reabsorción de K^+ en el riñón, la regulación del volumen celular y la proliferación celular [DeCoursey *et al*, 1984; Shuck *et al*, 1997; Ashcroft, 2000; Shieh *et al*, 2000; Hille, 2001; Oki *et al*, 2012].

El funcionamiento correcto de los canales de potasio es vital para los organismos que los poseen. Las mutaciones en un solo canal de K^+ están asociadas con distintas enfermedades como la *diabetes mellitus* tipo 2, la epilepsia, la ataxia episódica, el síndrome de QT largo, el síndrome de Bartter, la disfunción eréctil, algunos problemas de audición, y procesos como la oncogénesis o la apoptosis. Además de varios desordenes neurodegenerativos y neuromusculares [Ashcroft & Ashcroft, 1990; Sanguinetti *et al*, 1995; Miller, 2000; Shieh *et al*, 2000; Ptacek & Fu, 2004; Schenzer *et al*, 2005; Sandhiya & Dkhar, 2009; Huang & Jan, 2014]. De acuerdo con su estructura y sus propiedades funcionales, los canales de potasio se agrupan en familias y subfamilias. Existen tres familias principales de canales de potasio que consideran el número de segmentos TM de las subunidades alfa, más el número de regiones formadoras de poro: 2 segmentos TM con un poro, 4 segmentos TM con dos poros y 6 segmentos TM con un poro (Fig. 1.2) [IUPHAR/BPS, 2015].

Los canales iónicos forman complejos homo o heteroméricos, ensamblados con subunidades alfa de la misma subfamilia. Un canal iónico completo es un tetrámero, para los canales de un poro, o un dímero para los canales de dos poros [Huang & Jan, 2014]. Se ha descrito un canal de potasio de 7 segmentos TM, es activado por Ca^{2+} y de alta conductancia (BK_{Ca}). También se conocen canales de potasio de 8 segmentos TM, presentes sólo en levaduras [Biggin *et al*, 2000; Choe, 2002]; se cree que son híbridos de canales de dos y seis segmentos TM.

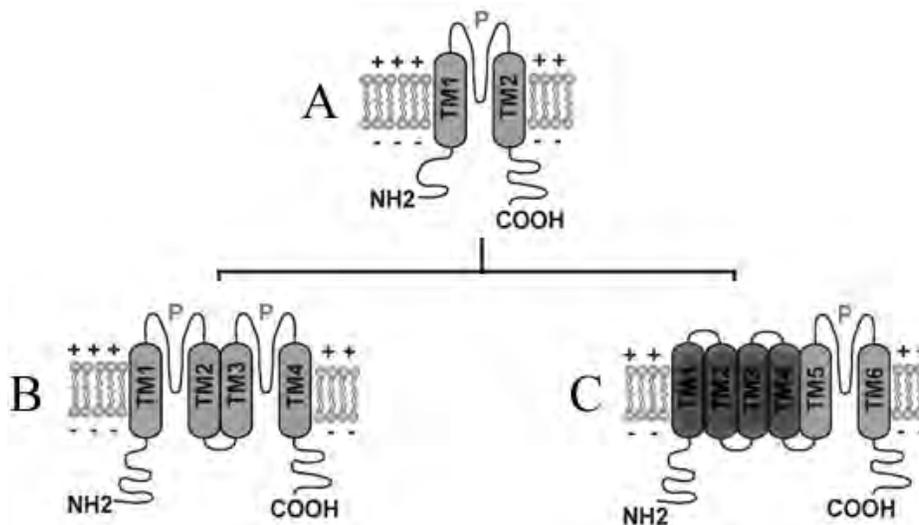


Figura 1.2 Familias principales de los canales de potasio (subunidades alfa). A) Dos segmentos TM con un poro, incluye la subfamilia de los rectificadores entrantes (K^+ inward rectifier, Kir). B) Cuatro segmentos TM con dos poros; en canales de fuga que permanecen abiertos constitutivamente (ej. TWIR). C) Seis segmentos TM con un poro; en los canales activados por Ca^{2+} , activados por Na^+ , y los canales dependientes de voltaje [Revisado por Sandhiya & Dkhar, 2009, imagen modificada de Huang & Jan, 2014].

La cristalización del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA, permitió conocer más sobre la estructura de los canales de K^+ . El canal KcsA tiene dos segmentos transmembranales en cada subunidad, se agrupa en homotetrámeros y permite el movimiento de K^+ hacia el exterior celular [Doyle *et al*, 1998; Morais-Cabral *et al*, 2001].

Este canal posee una secuencia que se conserva entre los distintos canales de potasio, particularmente en la región del poro (Thr-Val-Gly-Tyr-Gly) [Doyle *et al*, 1998]. La arquitectura del poro establece principios físicos que permiten la conducción selectiva de potasio, sobre otros cationes de carga positiva y de menor tamaño, como el ion sodio [Doyle *et al*, 1998; Zhou *et al*, 2001; Choe, 2002].

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

La familia de los canales de potasio de dos segmentos TM, también se conoce como la familia de los canales de potasio rectificadores entrantes (Inward-rectifier potassium ion channel, Kir). La familia Kir está formada por 7 subfamilias: Kir1.x – Kir7.x (Fig. 1.3). Su localización se ha descrito en una amplia variedad de células: cardiomiocitos, neuronas, osteoclastos, endotelio, epitelio, glía, músculo liso, riñón, leucocitos y ovocitos [Quayle *et al*, 1993, Kubo *et al*, 1993; Newman, 1993; Shuk 1997 y revisado por Hibino *et al*, 2010].

Los canales Kir ayudan a establecer el potencial de membrana en reposo de la célula (E_m), al encontrarse en un estado abierto permiten el movimiento iónico siempre a favor de su potencial electroquímico [Hagiwara & Takahashi 1974, Hagiwara *et al*, 1976]. Sin embargo, los canales rectificadores son de dirección única; es decir, permiten preferentemente el movimiento del ion en un sentido y no en el otro, aunque se encuentren abiertos (Fig. 1.4). Se les denomina rectificadores, por analogía a los diodos rectificadores en electrónica, que permiten el paso de los electrones en un sentido pero no en el otro [Corzo, 2005].

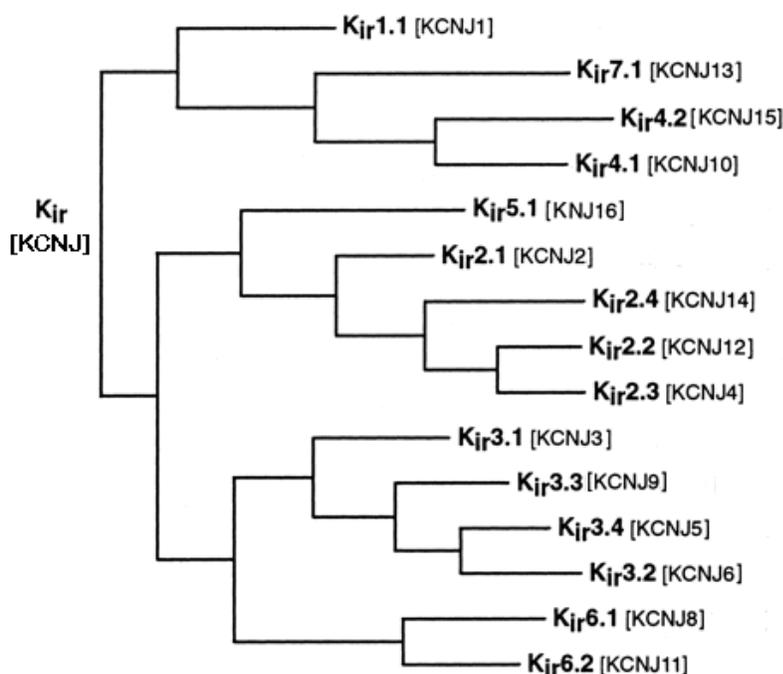


Figura 1.3 Dendrograma filogenético de la familia Kir o KCNJ [nomenclatura de la HUGO]. Esta familia incluye subfamilias con diferentes tipos de rectificación: los rectificadores fuertes (Kir2.x y Kir3.x), los rectificadores intermedios (Kir4.x) y los rectificadores débiles (Kir1.1 y Kir6.x) [Modificada de Gutman *et al*, 2003].

Sin embargo, la rectificación de los canales Kir puede ser distinta dependiendo de la subfamilia. Un rectificador fuerte permite el paso en un solo sentido de la membrana, mientras que un rectificador débil puede permitir el paso en ambos sentidos.

Los canales de la familia Kir se asocian en tetrámeros de la misma subfamilia y forman un solo poro. En cuanto a sus propiedades biofísicas, su apertura está regulada por distintos efectores, como fosfolípidos (PIP_2), pH [Hagiwara *et al.*, 1978], ATP (subfamilia Kir6.x) o proteínas G (subfamilia Kir3.x) [Hibino *et al.*, 2010]; su bloqueo ocurre por Ba^{2+} [Hagiwara *et al.*, 1978] o Cs^+ extracelular [Hagiwara *et al.*, 1976].

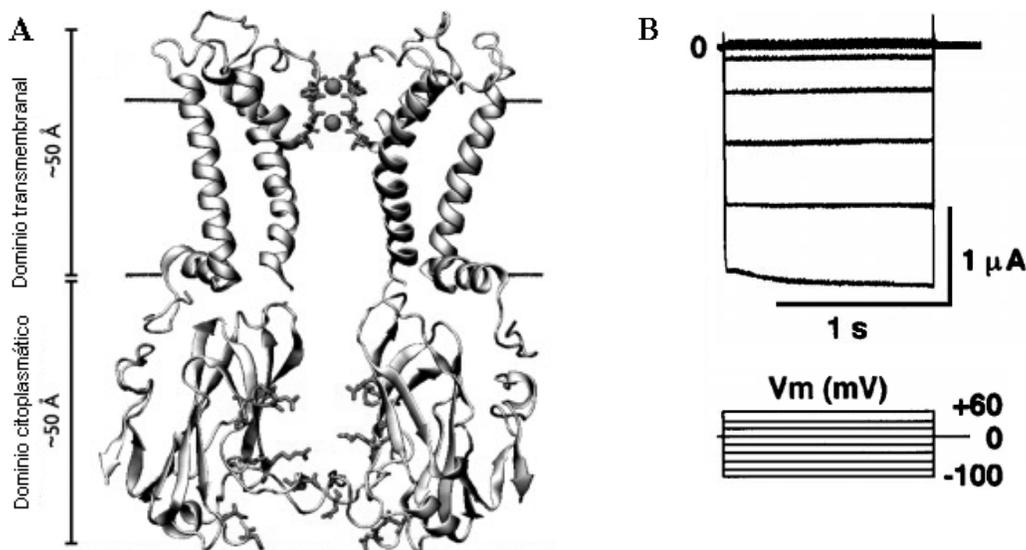


Figura 1.4 Estructura del canal Kir2.1 y rectificación entrante del canal Kir3.1/3.4. A) Modelo con dos subunidades del canal rectificador entrante Kir2.1. En la parte superior, el dominio transmembranal muestra la región del poro con el filtro de selectividad y un par de iones K^+ (esferas). B) Registro de la corriente iónica del canal Kir3.1-Kir3.4; las corrientes por debajo de cero μA corresponden a las corrientes entrantes. Debajo, el protocolo de pulsos de -100 mV a +60 mV, con incrementos de 20 mV [Modificado de Robertson *et al.*, 2012 y Yamada *et al.*, 1998].

La rectificación de los canales Kir (movimiento de iones en un solo sentido) está asociada al bloqueo asimétrico del poro; es decir, en voltajes despolarizantes, la disminución de la conducción iónica está asociada a la unión intracelular de Mg^{2+} [Vandenberg, 1987; Matsuda *et al.*, 1987] o poliaminas (espermina, espermidina y putresina [Ficker *et al.*, 1994, Lopatin, *et al.*

1994]). Por lo tanto, los canales Kir tienen una conductancia mayor mientras la célula se encuentra a voltajes hiperpolarizantes (menores al potencial de equilibrio del potasio, E_{K^+}) y permiten menor flujo de iones a voltajes más positivos que E_{K^+} (Fig. 1.5) [Hagiwara *et al*, 1976; Sakmann & Trube, 1984; Kurachi, 1985].

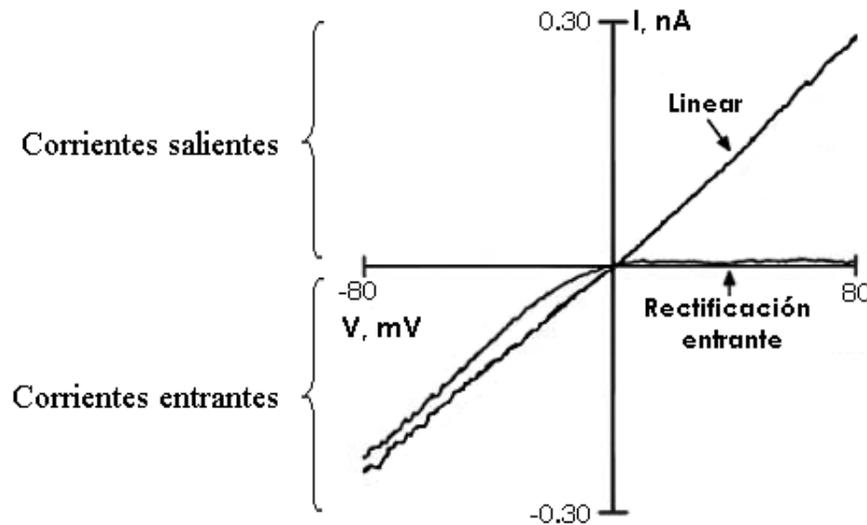


Figura 1.5 Curvas corriente (I, nA) vs voltaje (V, mV), a concentraciones iguales de K^+ (100mM), en ambos lados de la membrana. La conductancia lineal representa un canal que permite la conducción en ambos sentidos, corrientes entrantes ($I < 0$) y salientes ($I > 0$). La conductancia de un rectificador entrante corresponde a un canal que conduce en una sola dirección, muestra corrientes entrantes ($I < 0$), pero a voltajes mayores al E_K ($mV=0$) no presenta corrientes de salida ($I \sim 0$) [Lu & MacKinnon, 1994; Nishida & MacKinnon, 2002].

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

La subfamilia KIR 3, comprende los **canales de potasio rectificadores entrantes activados por proteínas $G\beta\gamma$** , también denominados **GIRK**. Se han reportado 5 miembros de esta subfamilia. Los canales GIRK1 [Kubo *et al*, 1993] y GIRK4 [Krapivinsky *et al*, 1995] se clonaron del nodo sinoauricular de ratón y rata, respectivamente; los canales GIRK2 y GIRK3 se clonaron del cerebro de ratón [Lesage *et al*, 1994] y el canal GIRK5 se clonó de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Hedin *et al*, 1996].

Los canales GIRK de mamífero se agregan principalmente como heterotetrámeros [Kofuji *et al*, 1995] y se asocian con el canal GIRK1 para formar canales funcionales (Tabla 1.1) [Kofuji *et al*, 1995; Kennedy *et al*, 1999, Jelacic *et al*, 1999 y 2000]. GIRK1 co-localiza con GIRK4 en la aurícula del corazón [Krapivinsky *et al*, 1995] y co-localiza con GIRK2 o GIRK3 en varias zonas cerebrales [Lesage *et al*, 1995]. También se han descrito la asociación en homotetrámeros para el canal GIRK2 [Kofuji *et al*, 1995; Lesage *et al*, 1995; Slesinger *et al*, 1996; Inanobe *et al*, 1999a y 1999b] y para GIRK4 [Kofuji *et al*, 1995; Corey & Clapham, 1998], aunque su magnitud de corriente es mayor cuando se co-expresan junto con GIRK1 [Kofuji *et al*, 1995].

La apertura de los canales GIRK está regulada por las proteínas G heterotriméricas del tipo Gi/o (sensibles a la toxina *perstussis*) [Pfaffinger *et al*, 1985; Reuveny *et al*, 1994], por PIP₂ [Logothetis *et al*, 1987; Huang *et al*, 1998], Na⁺ [Lesage *et al*, 1995], proteínas RGS (Regulators of G protein signaling) [Doupnik *et al*, 1997] y la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (GPCR) [Pfaffinger *et al*, 1985]. Las subunidades G-β1 y G-γ2 son las que principalmente se unen a las regiones amino y carboxilo terminal de los canales GIRK, para permitir la activación de los canales (Fig. 1.6) [Logothetis *et al*, 1987; Kofuji *et al*, 1995; Reuveny *et al*, 1994].

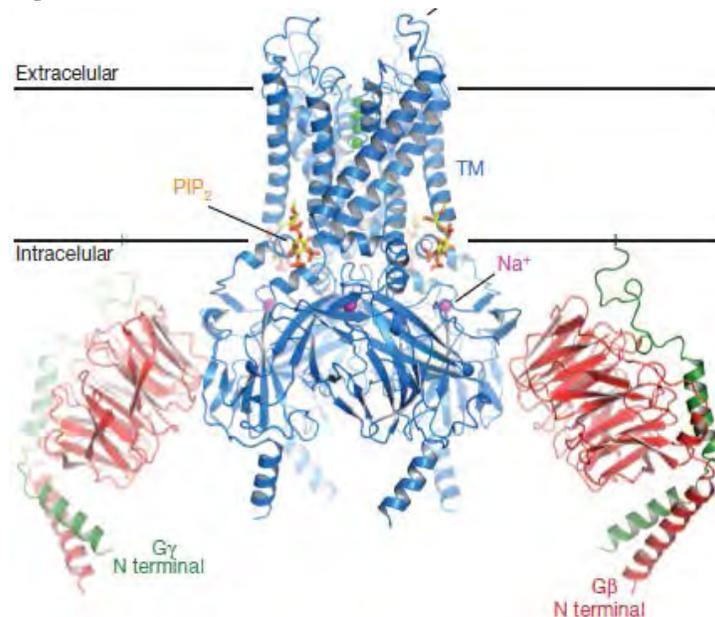


Figura 1.6 Estructura del complejo proteico GIRK - Gβγ. Vista lateral del complejo formado por el canal GIRK2 más las subunidades Gβγ de las proteínas G heterotriméricas. La bicapa lipídica se representa con dos líneas horizontales y en medio se encuentra la región transmembranal (TM) del canal GIRK. Se indica con líneas la unión de un ion Na⁺ y una molécula de PIP₂ [Tomado de Whorton & MacKinnon, 2013].

Los neurotransmisores como la acetilcolina, dopamina, opioides, serotonina, somatostatina o adenosina también activan a los canales GIRK al interactuar con su receptor metabotrópico [Pfaffinger *et al*, 1985; Lüscher & Slesinger, 2010] (Fig. 1.7). Por ejemplo, la activación del heteromultímero GIRK1/GIRK4 ocurre a través de interacción de la acetilcolina con sus receptores muscarínicos [Krapivinsky *et al*, 1995; Kofuji *et al*, 1995].

Estudios electrofisiológicos, junto con la cristalización del complejo GIRK-G $\beta\gamma$, sugieren que existen complejos proteicos macromoleculares formados por los receptores acoplados a proteínas G, las proteínas G heterotriméricas y los canales GIRK (GPCR-G $\alpha\beta\gamma$ -GIRK); además, los diferentes ligandos (proteínas G, proteínas RGS, PIP2 y Na⁺) interactúan dependiente y simultáneamente con los canales GIRK para poder regular su apertura [Lüscher *et al*, 2010; Whorton & MacKinnon, 2011, 2013].

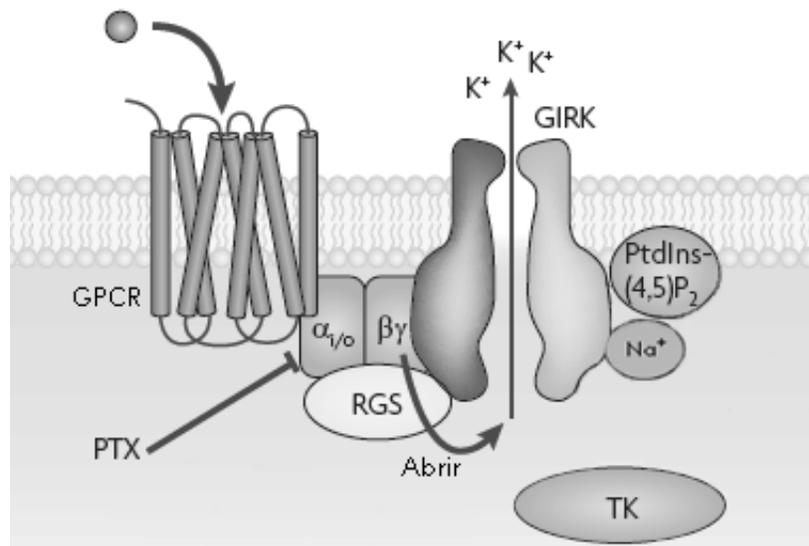


Figura 1.7 Macrocomplejo de activación de los canales GIRK. Asociación de los canales GIRK con los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), las proteínas G heterotriméricas, las proteínas RGS, PIP2 y Na⁺; juntos permiten la activación de los canales GIRK. Las cinasas de tirosinas (TK) también pueden modular los canales GIRK y la toxina *pertussis* (TP) inhibe su activación [Modificado de Lüscher & Slesinger, 2010].

Los canales GIRK participan en la regulación del potencial de reposo de las células. En condiciones fisiológicas, el potencial de membrana es ligeramente mayor al potencial de equilibrio del ion potasio, E_{K^+} ; en voltajes de membrana despolarizantes (por encima del E_{K^+}), los canales GIRK tienen una disminución de las corrientes entrantes y permiten corrientes de salida de K⁺, lo cual origina una hiperpolarización de la membrana, característica de los canales

GIRK (Fig. 1.8). La actividad basal de los canales GIRK contribuye al potencial de membrana en reposo, cambiando el voltaje de la membrana por aproximadamente -8 mV. Por lo tanto los canales GIRK juegan un rol importante en la regulación inhibitoria de la excitabilidad neuronal, los potenciales postsinápticos hiperpolarizantes en el sistema nervioso y en el corazón al mediar el ritmo cardiaco [North, 1989; Wickman *et al*, 1998; Lüscher & Slesinger, 2010].

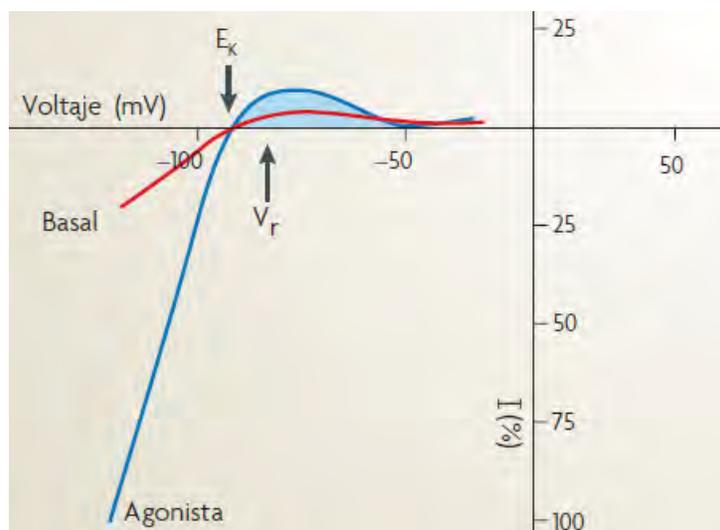


Figura 1.8 Curva corriente relativa (I %) vs voltaje (mV) de un registro de un canal GIRK neuronal. El potencial de equilibrio de potasio (E_K^+) cercano a -90 mV. La curva en rojo corresponde a la actividad basal, la curva azul a la actividad inducida por agonistas de GPCR. Ambas muestran la rectificación entrante (grandes corrientes entrantes y pequeñas corrientes de salida). Las corrientes salientes entre el potencial de reposo de la célula (V_r) y el E_K^+ hiperpolarizan el potencial de membrana. [Lüscher & Slesinger, 2010].

En cuanto a su farmacología, los canales GIRK de mamíferos se activan directamente con etanol [Kobayashi *et al*, 1999; Lewohl *et al*, 1999, Bodhinathan & Slesinger, 2013] y al ser miembros de la familia Kir se bloquean por Ba^+ y Cs^+ extracelular. El grupo de Kobayashi ha reportado durante muchos años, numerosas sustancias que inhiben los canales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 del sistema nervioso, como los antidepresivos tricíclicos y fármacos antipsicóticos (imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, entre otros) [Kobayashi *et al*, 2004]. Dicha inhibición podría contribuir a algunos de los efectos terapéuticos y también a algunos de los efectos adversos como las convulsiones y las arritmias auriculares.

También se ha observado la participación de los canales GIRK en algunos procesos que regulan la ingesta de alcohol o el abuso de drogas. Sin embargo, la relación de estas sustancias con la apertura de los canales GIRK puede darse de formas diferentes. Mientras que la cocaína inhibe los canales GIRK, el etanol permite su apertura de forma instantánea. Otras sustancias como la cafeína, cannabinoides, alucinógenos, opioides, anfetaminas o neurotransmisores (dopamina, serotonina, GABA, etc.) requieren las vías de transducción de señales, por medio de receptores acoplados a proteínas Gi/o o segundos mensajeros, para regular la apertura de los canales GIRK [ver Sugaya *et al*, 2013].

Aunque estos compuestos pueden afectar la regulación de los canales GIRK, las vías en las que participan son complejas y no se han descrito completamente a la fecha. El uso de animales silenciados genéticamente puede mostrar la complejidad de las vías, donde están involucrados estos canales, en el sistema nervioso central.

Por ejemplo, el silenciamiento del canal GIRK3 no origina cambios aparentes, excepto en la respuesta a las sustancias adictivas, cuando participa en el sistema de motivación-recompensa. En 2003, se describió en un estudio con ratones *knockout* para GIRK3, que éstos mostraban una auto-administración disminuida de cocaína [Morgan *et al*, 2003]; se determinó que estos canales contribuían al reforzamiento por la droga, pero no se pudo determinar en cual vía dopaminérgica participaban. Posteriormente, en 2015, se observó en otro estudio con ratones que la eliminación constitutiva de GIRK3 originaba un consumo excesivo de etanol, pero cuando se expresaba de nuevo GIRK3 en el área ventral tegmental, el consumo de etanol disminuía a los niveles basales. Se encontró que el canal GIRK3 es esencial para la activación de la vía mesolímbica dopaminérgica activada por alcohol y cuando este canal falta, la vía de motivación-recompensa se ve alterada [Herman *et al*, 2015]. Así, los niveles de un canal GIRK en un área particular pueden ser críticos para la sensibilidad a ciertos compuestos y por lo tanto podrían utilizarse como blancos terapéuticos.

El silenciamiento específico de los canales GIRK también ha permitido demostrar su importancia en la fisiopatología de algunas enfermedades. En el sistema nervioso, una función anormal de los canales GIRK se ha relacionado con alteraciones de la excitabilidad neuronal y la muerte celular. La pérdida de su función puede ocasionar una excitabilidad excesiva (crisis epilépticas), mientras que un aumento en su función puede reducir considerablemente la actividad neuronal (postulado para el síndrome de Down). Por otra parte, una pérdida de la selectividad que permita el flujo de iones Na⁺, puede originar la muerte celular (modelo de la enfermedad de Parkinson) [Kobayashi *et al*, 2004; Lüscher & Slesinger, 2010].

La presencia de los canales GIRK no está restringida a células excitables (Tabla 1.1). En plaquetas humanas se han encontrado los canales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 que son activados a través de los receptores P2Y₁₂ acoplados a proteínas G [Shankar *et al*, 2004]. En células cancerosas de pulmón se ha detectado la expresión de ARNm de los canales GIRK 1-4 [Plummer *et al*, 2005]; en líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado la existencia de canales funcionales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 involucrados en la señalización celular [Dhar & Plummer, 2006]; en algunos casos de aldosteronismo se han encontrado adenomas, en las glándulas suprarrenales, con canales GIRK4 (mutados) que permiten la entrada de sodio, la despolarización celular y la producción constitutiva de aldosterona [Mulatero *et al*, 2013].

La quinta isoforma, GIRK5, se clonó de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Hedin *et al*, 1996). El canal GIRK5 se agrega en homotetrámeros funcionales. En las células foliculares, y en los ovocitos de *X. laevis*, la unión de adenosina a su receptor endógeno acoplado a proteínas G (del tipo Gi/o) puede activar los canales GIRK a través de las subunidades G beta-gamma (Gβγ) [Kobayashi *et al*, 2002]; sin embargo, también existe una poza endógena de subunidades βγ, que permiten la apertura del canal GIRK5 [Lutz *et al*, 2000; Hedin *et al*, 1996].

Tabla 1.1

Localización y asociación de las subunidades alfa, de la subfamilia GIRK

Multímeros	Tipo de células	Multímero	Localización	Organismo
Hetero-tetrámeros	Excitables	GIRK1/GIRK4	Corazón	Mamíferos (humano, rata y ratón)
		GIRK1/GIRK(2,3,4)	Sistema nervioso	
	No excitables	GIRK1/GIRK(2,4)	Plaquetas	
		GIRK1/GIRK2 GIRK1/GIRK4	Células cancerosas (mama y pulmón)	
Homo-tetrámeros	No excitables	GIRK2d	Sistema nervioso	
		GIRK4	Adenomas de glándulas adrenales	
		GIRK5	Ovocitos	Anfibio <i>X. laevis</i>

1.2 Localización intracelular de proteínas

Las células de los organismos eucariotes están altamente compartimentalizadas y cada organelo cuenta con proteínas particulares que le confieren su identidad. Estas células cuentan con mecanismos altamente específicos para transportar proteínas, garantizar su destino o mantenerlas como ‘residentes’ en alguno de los organelos, y con ello asegurar su buen funcionamiento.

El tránsito de proteínas dentro de las células es mejor conocido como tráfico intracelular, su mecanismo es muy complejo y en él interviene una amplia variedad de actores moleculares [Alberts *et al*, 2004; van Vliet *et al*, 2003; Pollard *et al*, 2008]. ¿Cómo es posible que una proteína de membrana se transporte en forma eficiente, a un destino particular, en una célula en la que se encuentran presentes miles de proteínas?

El tráfico de las proteínas ocurre gracias al el reconocimiento de información estructural que poseen todas las proteínas y que las dirige hacia su destino correcto. Esto ocurre a través de señales de localización, codificadas por secuencias de aminoácidos llamadas secuencias topogénicas o motivos, que equivalen a un “código postal” celular [Blobel & Sabatini, 1971; Blobel, 1980].

Sin embargo, los motivos de aminoácidos no son suficientes para el tráfico de una proteína, se necesitan arreglos complejos de otras proteínas que interaccionen con ellos. Existen proteínas adaptadoras que reconocen los motivos de las proteínas; las proteínas de cubierta que favorecen la formación de vesículas, tanto transportadoras (para que las proteínas cargo se muevan entre los organelos celulares), como vesículas diana (que permiten la unión con la membrana blanco). La especificidad de las proteínas adaptadoras y las de anclaje varía en cada organelo, gracias a lo cual puede ocurrir el transporte dirigido de las vesículas.

1.2.1 Vías de tráfico intracelular

En la célula el tráfico de las proteínas puede suceder en dos sentidos; uno es el transporte anterógrado que va desde el Retículo Endoplásmico (RE) hacia la membrana plasmática (vía secretora); el otro ocurre de forma retrógrada, desde la membrana plasmática hacia endosomas (vía endocítica) o desde el Aparato de Golgi hacia el RE (Fig. 1.9).

La vía secretora coincide con la ruta que siguen las proteínas durante su formación. La síntesis de proteínas comienza en los ribosomas. Las proteínas citoplasmáticas se sintetizan en los ribosomas libres del citosol; mientras que, las proteínas transmembranales o de secreción se forman en los ribosomas del RE Rugoso. Dentro del RE las proteínas se revisan para asegurar su plegamiento correcto antes de ser empacadas en vesículas, una vez listas pasan hacia el compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi, ERGI (ER-Golgi intermediate compartment). Después del ERGI continúan por las cisternas del aparato de Golgi (cis, medial, trans) hacia la red de *trans*-Golgi (TGN, Trans Golgi Network). En el TGN las proteínas se clasifican hacia su destino final [Alberts *et al*, 2004; Lodish *et al*, 2000; van Vliet *et al*, 2003; Pollard *et al*, 2008].

La vía endocítica de las proteínas permite que aquellas que se encuentran en la membrana plasmática, se puedan internalizar en los distintos tipos de endosomas, viajar hacia un organelo (como los lisosomas) o bien reciclarse (volver a la membrana plasmática). También por esta vía una proteína puede regresar al compartimento anterior de la vía secretora.

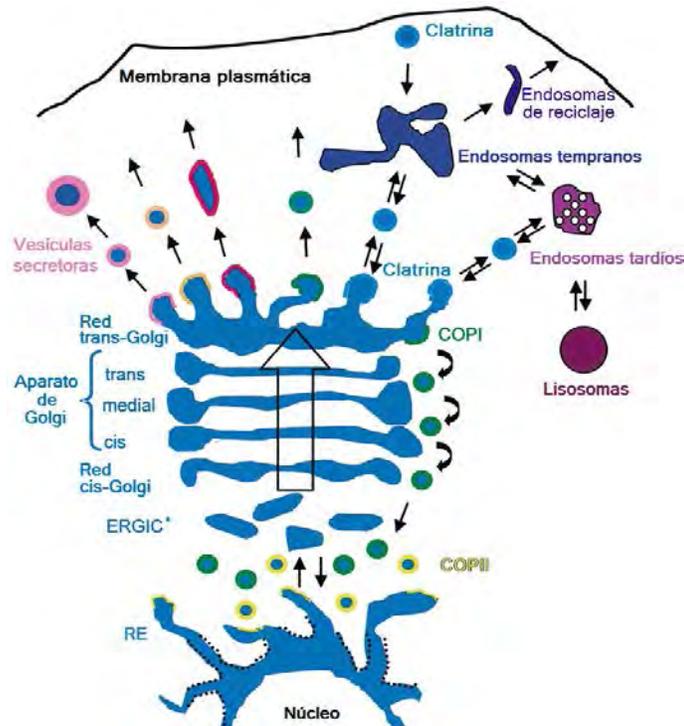


Figura 1.9 Componentes de la vía secretora y vía endocítica de proteínas. Las proteínas recién sintetizadas salen del retículo endoplásmico (RE) y viajan hacia el Aparato de Golgi, para después ser dirigidas a su destino final. La vía endocítica permite el retorno de proteínas, la internalización y reciclaje de proteínas de membrana a través del sistema endosomal. Las proteínas de cubierta como clatrina, COPI y COPII permiten el movimiento de las vesículas entre organelos [van Vliet *et al*, 2003].

A continuación se describen algunos compartimentos:

* Retículo endoplásmico (RE).

El RE comprende una serie de túbulos y sáculos aplanados interconectados, cuya membrana se continúa con la envoltura nuclear [Alberts *et al*, 2004]. El RE rugoso es el organelo donde terminan de traducirse las proteínas de secreción y las proteínas que residen en la vía secretora [Pollard *et al*, 2008]. Una pequeña secuencia continua de aminoácidos en el amino terminal de los péptidos recién sintetizados, conocida como péptido señal, determina la localización en la membrana del RE [Blobel & Sabatini, 1971; Blobel, 1980; Walter & Jonhson, 1994]. Las proteínas de membrana se mantienen en la membrana del RE durante su traducción [Do *et al*, 1996]. Las proteínas solubles pierden la secuencia del amino terminal por la acción de una peptidasa-señal, presente en el lado luminal de la membrana del RE [Martoglio & Dobberstein, 1998]. En consecuencia, permanecen solubles hasta que son secretadas o llegan a residir en algún organelo. El RE funciona como el control de calidad de las proteínas recién sintetizadas, en él se revisa el plegamiento correcto antes de permitir su camino en la vía secretora y también se encarga de comenzar la N-glicosilación [Pollard *et al*, 2008].

* Compartimento intermedio entre RE y Golgi (ERGIC).

Las proteínas se exportan del RE como elementos de transición o en el RE de transición (tER). El tER son secciones de RE liso y están adyacentes al RE rugoso. El tER se encuentra cercano al área cis-Golgi y también se ha observado a lo largo de la periferia de la célula. El tER comprende dominios especializados para la producción de vesículas de transporte. Las vesículas se fusionan y forman una red vesicular y tubular, conocida como pre-Golgi o compartimento intermedio entre el RE y Golgi (ERGIC). El compartimento ERGIC es una estación donde se clasifican las proteínas: se reciclan hacia el RE o se transportan hacia el cis-Golgi [revisado por van Vliet *et al*, 2003].

* Aparato de Golgi.

El aparato de Golgi es una red membranosa, formada por una serie de cisternas aplanadas, que se encuentra en las proximidades del núcleo y cerca del centrosoma de la célula [Thyberg & Moskalewski, 1998]. El aparato de Golgi está rodeado por dos compartimentos túbulo-vesiculares, la red cis-Golgi (CGN) y la red trans-Golgi (TGN). La CGN recibe las proteínas que provienen del RE una vez que han pasado por el complejo ERGIC, y las transporta a través de

las cisternas cis-, media- y trans-, hacia la red TGN. El aparato de Golgi tiene como papel principal la glicosilación (O-glicosilación o terminar la N-glicosilación) y la clasificación correcta de las proteínas [Alberts *et al*, 2004].

* Red trans-Golgi (TNG)

La TGN presenta características que son funcional y morfológicamente distintas a las cisternas de Golgi. La TGN es una red túbulo-reticular y tiene vesículas con cubiertas distintas a las que tienen las cisternas previas. Algunos procesos son exclusivos de la TGN como: la sialilación, el procesamiento proteolítico y la sulfatación de las tirosinas. Este compartimento es altamente dinámico y está involucrado en la clasificación de las proteínas que vienen desde el RE y que tienen destinos múltiples. La TGN clasifica y ‘empaqueta’ a las proteínas en vesículas acarreadoras, que pueden transportarse hacia los lisosomas, las vesículas de secreción, a la membrana apical o basolateral en las células epiteliales, al sistema endosomal o bien regresarse al compartimento anterior [revisado por van Vliet *et al*, 2003].

1.2.2 Motivos de localización intracelular

Los motivos o señales de localización pueden determinar que una proteína avance en la vía o resida en el RE, el cis-Golgi, las cisternas de Golgi, el trans-Golgi, las vesículas de secreción, los lisosomas, el sistema endosomal, la membrana plasmática o se secrete al espacio extracelular [Blobel, 1980; van Vliet *et al*, 2003].

Un motivo se define como una región, dominio específico o secuencia breve de aminoácidos que se comparte entre proteínas, que no necesariamente presentan similitud en el resto de sus secuencias y que indica una correlación funcional en las proteínas que lo poseen. Así, los motivos presentes en una proteína determinan su destino celular [Blobel, 1980].

Aunque las secuencias puedan variar, los motivos tienden a poseer funciones similares conservando su secuencia y estructura. Los motivos se han conservado a lo largo de la evolución y son el resultado de una selección sobre regiones específicas de las proteínas, que prevalecieron por ser requerimientos estructurales y/o funcionales importantes. Propiedades físicas tales como la hidrofobicidad, frecuentemente demuestran ser más importantes en el proceso de reconocimiento de la señal que la secuencia de aminoácidos exacta [Lodish *et al*, 2000].

En algunas ocasiones existe más de un motivo en las proteínas; sin embargo, hay casos en que los motivos son únicos e imprescindibles. Una o más mutaciones en los motivos pueden llevar a la pérdida de la función de la proteína y tener impacto no sólo a nivel celular, sino en la fisiología sistémica del organismo.

Muchas proteínas no tienen secuencias de clasificación y consecuentemente permanecen en el citosol. Las proteínas cuyo destino es ser secretadas o residir a lo largo de la vía secretora, poseen un *péptido señal* que dirige a las proteínas en formación hacia el Retículo Endoplásmico (RE); está formado por uno o más residuos de aminoácidos de carga positiva, seguido por un segmento continuo de 6-12 residuos hidrófobos. En las proteínas integrales de membrana, como los transportadores y los canales iónicos, el primer segmento α -helicoidal inicia la inserción en la membrana del RE y una secuencia de hasta 25 aminoácidos asegura que una proteína adquiera la orientación adecuada [Lodish *et al*, 2000].

Algunas de las proteínas, que en un principio se transfieren hacia el RE viajarán hacia el aparato de Golgi, pero aquellas con los motivos KDEL, KKXX o RRXX en alguno de sus extremos terminales se identifican como proteínas residentes del RE y, en caso de salir a la vía secretora, se recuperan por transporte retrógrado [Pelham, 1996]. De esta forma se seleccionan las proteínas que deben recorrer la vía secretora de aquellas que deben permanecer en el RE [Alberts *et al*, 2002; Lodish *et al*, 2002; van Vliet *et al*, 2003].

Las proteínas de las mitocondrias tienen motivos con residuos de aminoácidos básicos que alternan con aminoácidos hidrofóbicos. Las proteínas destinadas a los peroxisomas tienen un péptido señal con tres aminoácidos característicos, SKL, en su carboxilo terminal [Lodish *et al*, 2000].

En la última sección del aparato de Golgi (TGN) la clasificación de las proteínas a sus destinos finales también dependerá de las señales de localización que presenten. Algunos motivos se resumen en la tabla 1.2.

Tabla 1.2

Motivos de localización de proteínas en distintos tipos de organelos(Lodish *et al*, 2000, Alberts *et al*, 2004 y Bonifacino & Traub, 2003)

Motivo	Función
Lys-Lys-Lys-Arg-Lys	Importación al núcleo *
Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly- Leu-Asp-Ile	Exportación del núcleo
Ser-Lys-Leu-COO ⁻	Importación a peroxisomas
NH ₂ -Met-Val-Ala-Met-Ala-Met- Ala- Ser -Leu-Gln- Ser-Ser -Met- Ser-Ser -Leu- Ser -Leu- Ser-Ser - Asn- Ser -Phe-Leu-Gly-gln-Pro- Leu- Ser -Pro-Ile- Thr -Leu- Ser - Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-	Exportación a mitocondrias *
Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu- Phe-Trp-Ala	Importación al RE *
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	Proteínas luminaras residentes en el RE
Lys-Lys-X-X / Arg-Arg-X-X (KKXX) / (RRXX)	Proteínas de membrana residentes en el RE (dominio citosólico)
Manosa 6-fosfato (M6P)	Localización al sistema de endosomas. Enzimas lisosómicas solubles después de ser procesadas en el <i>trans</i> -Golgi
Asn-Pro-Phe-X(1,2)-Asp NPFX(1,2)D	Internalización
Phe-Trp o Pro(n) FW o varias Prolinas	Clasificar de endosomas a TGN
Ubiquitina	Internalización, localización lisosomal y vacuolar

* La secuencia mostrada es una secuencia típica, pero no exacta, de los motivos. Los residuos relevantes para la función se muestran en negritas y subrayados.

1.2.3 Reconocimiento de los motivos en el tráfico vesicular

El tráfico intracelular de proteínas ocurre por tres mecanismos: 1) por poros, por ejemplo entre el citosol y el núcleo; 2) por un transporte transmembranal, donde los complejos unidos a la membrana translocan a las proteínas, por ejemplo, desde el citosol hacia el RE y 3) el transporte vesicular, con intermediarios que son pequeñas vesículas esféricas, tubulares o fragmentos de organelos irregulares [Alberts *et al*, 2004].

El transporte por vesículas comienza con moléculas acarreadas desde un compartimento que se descargan en otro. El movimiento sucede tanto en el transporte anterógrado como en el transporte retrógrado. La identificación correcta de los motivos, la formación de las vesículas, su transporte y el anclaje, son procesos cruciales. Para ello es necesaria la participación de una gran cantidad de proteínas.

La formación de las vesículas de transporte se da a partir de secciones de membrana del organelo donador (de donde parten las vesículas) y requiere ‘proteínas de cubierta’ como la clatrina, COP I y COP II. Una vez formadas, éstas se separan del organelo, después pierden sus proteínas de cubierta (clatrina) y viajan ‘desnudas’ hacia su organelo receptor a través del citoesqueleto. Al llegar, la interacción específica de proteínas de ambas membranas permite la fusión de la vesícula con el organelo diana.

Las vesículas además requieren de proteínas motoras que generen un movimiento direccional y viajen a través de las redes del citoesqueleto, formado de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Las proteínas motoras responsables del movimiento asociado a los microfilamentos de actina son las miosinas, mientras que las asociadas a los microtúbulos son dos: las kinesinas y las dineínas [Lodish *et al*, 2002].

Todo este proceso requiere de energía. A lo largo de la vía secretora y endocítica están distribuidas proteínas GTPasas pequeñas que catalizan la separación de las vesículas del organelo donador o la fusión con el organelo receptor (Fig. 1.10) [Chavrier *et al*, 1990]. Estas enzimas son monoméricas y varían entre organelos, algunos ejemplos son la Sar1, la ARF, las Rabs, Rho y dinamina. Las GTPasas tienen proteínas efectoras que permiten que hidrolizen el GTP a GDP. Estas enzimas son diferentes en cada organelo y permiten la especificidad del tráfico de proteínas [Sönnichsen *et al*, 2000].

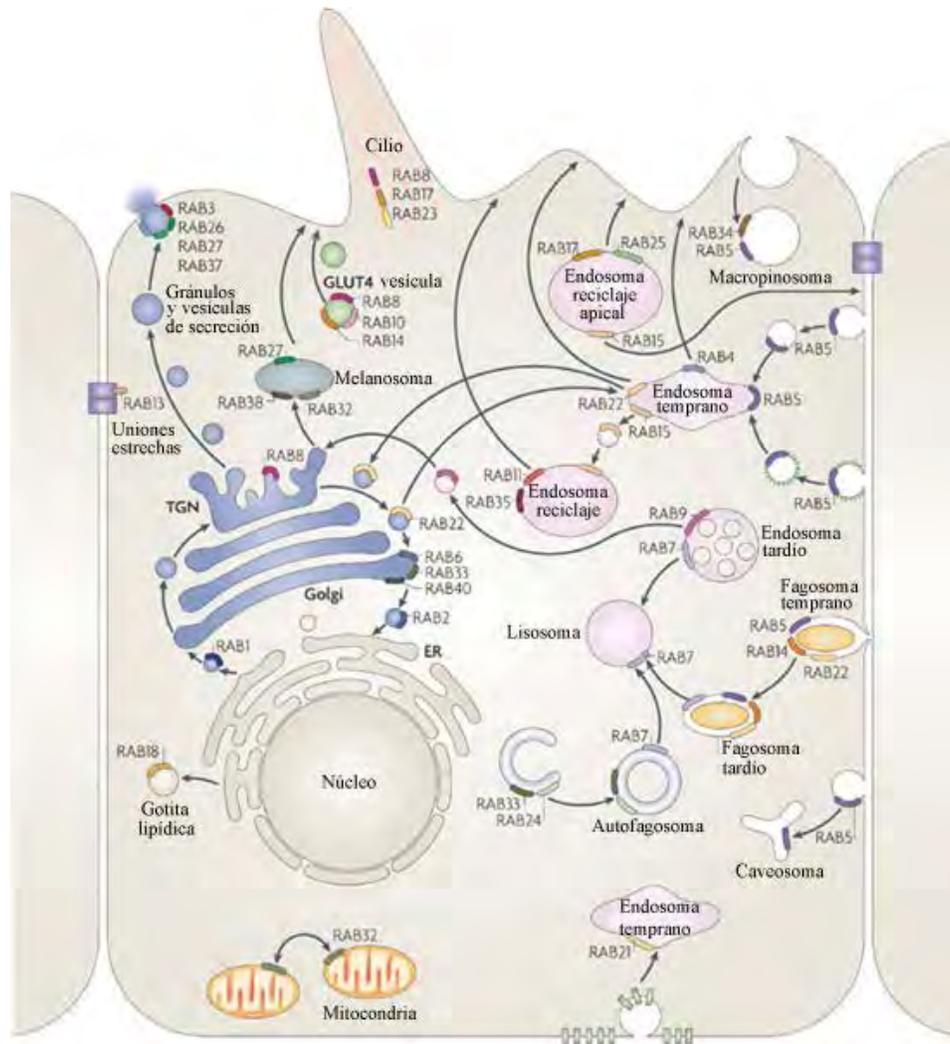


Figura 1.10 Ejemplo de la distribución intracelular de las GTPasas pequeñas **Rabs**. Cada organelo y vesícula de transporte tiene Rabs específicas que permiten el transporte dirigido de proteínas cargo [Stenmark, 2009].

El transporte dirigido implica que los motivos de las proteínas transportadas sean reconocidos por unidades proteicas específicas. Los motivos de las proteínas cargo se pueden reconocer directamente por las proteínas de cubierta. En otros casos los motivos son reconocidos primero por proteínas adaptadoras, y éstas son reconocidas por la proteína de cubierta, como COP I, COP II o clatrina (Fig. 1.11). La formación de vesículas cubiertas con estas proteínas se describe a continuación.

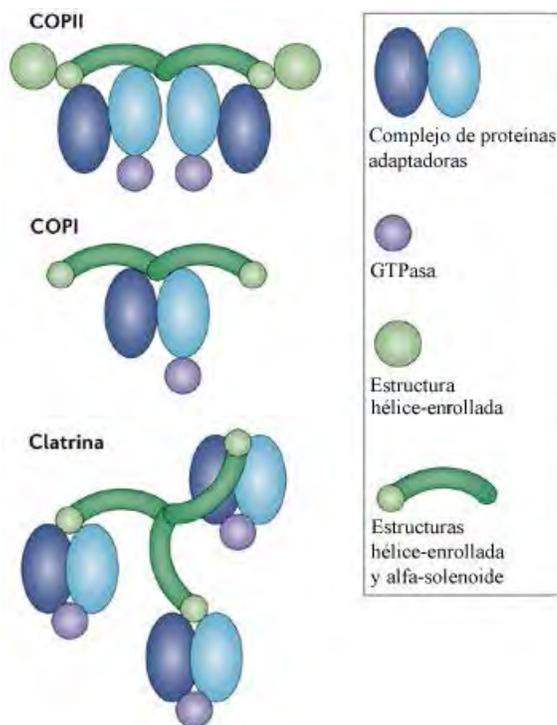


Figura 1.11 Representación esquemática de los complejos de las proteínas de cubierta COPII, COPI y clatrina. Estas representaciones enfatizan la estructura conservada a lo largo de la evolución y la homología funcional entre ellas [Gürkan *et al*, 2006].

En la vía secretora, el tráfico de proteínas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi involucra vesículas cubiertas de **COP II**. La cubierta de COP II está formada por dos complejos heterodiméricos de proteínas denominadas Sec [Barlowe *et al*, 1994]. La enzima GTPasa que participa es Sar1 y la proteína Sec12 actúa como GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), es decir, activa a Sar1 al intercambiar su GDP por GTP [Barlowe & Schekman, 1993]. Primero Sar1-GTP se une a la membrana del RE, recluta a Sec23/Sec24, que a su vez recluta a Sec13/Sec31 [Schekman & Orci, 1996; Stagg *et al* 2006]. La polimerización de estas subunidades deforma la membrana y origina la formación de la vesícula. Las proteínas de cubierta se utilizan para separar la vesícula de su membrana donadora; una vez que se separó, se hidroliza el GTP unido a Sar1 y se disocia la cubierta. La proteína Sec23 actúa como GAP (proteína que activa a las GTPasas, GTPase Activating Protein), y promueve la actividad GTPasa de Sar1 [Yoshihisa *et al*, 1993]. Aunque se conoce el mecanismo de la formación de vesículas recubiertas por COP II, es controversial el reconocimiento de las proteínas cargo [Nufer *et al*, 2002]. Sin embargo, puede decirse que se han caracterizado dos motivos de exportación de proteínas desde el RE, uno está formado por dos residuos de fenilalanina [Kappeler *et al*, 1997] y el otro por dos residuos ácidos [Nishimura & Balch, 1997].

Por otra parte, las proteínas de cubierta **COP I** median el tráfico retrogrado en las cisternas del aparato de Golgi y del ERGIC al retículo endoplásmico. Las COP I son coatómeros formados por 7 subunidades peptídicas [Malhotra *et al*, 1989]. El mecanismo de la formación de vesículas es similar al de COP II. Participa una proteína GEF, que intercambia el GDP por GTP en la GTPasa ARF1 [Chardin *et al*, 1996]. ARF-GTP se une a la membrana y recluta al coatómero, lo que causa la deformación de la membrana. La vesícula se recubre y se separa, ARF-GTP se activa por una GAP de ARF, se hidroliza el GTP y la cubierta se disocia [Tanigawa *et al*, 1993; Orci *et al*, 1993]. En el reconocimiento de las proteínas cargo participa la familia de proteínas transmembranales p24 [Kaiser, 2000]. Las secuencias KKXX y KDEL son secuencias típicas de transporte retrógrado de proteínas de membrana, del aparato de Golgi al RE [Jackson *et al*, 1993].

En el transporte desde la TGN hacia los endosomas, o desde la membrana plasmática hacia endosomas la proteína de cubierta que participa es la **clatrina**. Cada subunidad de clatrina está formada por tres cadenas polipeptídicas ligeras y tres pesadas que forman una estructura de tres ‘brazos’ conocida como trisquelión, que cuando se polimerizan originan una red poligonal que curva la membrana [Marsh & McMahon, 1999]. Al igual que con COP I, una GEF activa ARF y entonces la clatrina comienza a reclutarse, pero además para unirse necesita la presencia de complejos proteicos heterotetraméricos conocidos como complejos AP o adaptinas [Schmid, 1997]. Una vez que la vesícula está formada y recubierta, requiere de la actividad GTPasa de la dinamina para separarse completamente [van der Bliet *et al*, 1993]. Es entonces cuando la auxilina se une a la cubierta de clatrina, recluta a la chaperona Hsc70 y con la hidrólisis de ATP, cataliza el desensamblaje de la cubierta [Ungewickell *et al*, 1995].

Los complejos de proteínas adaptadoras reconocen selectivamente los motivos que están presentes en las regiones intracelulares de las proteínas cargo. Los complejos AP se unen a secuencias determinadas y actúan como puente entre la clatrina y las proteínas. El reconocimiento y la interacción específica de los complejos AP permiten que se incorporen las proteínas en las vesículas nacientes que serán transportadas [Rohn *et al*, 2000].

En la tabla 1.3 se resume en dónde se localizan las proteínas adaptadoras, con que proteínas de cubierta interactúan, qué motivos reconocen, y cuál es el destino de las proteínas que presentan estos motivos.

Tabla 1.3

Proteínas adaptadoras, localización y los motivos que reconocen

Proteína adaptadora	Localización	Organelo diana	GTPasa	Proteína de cubierta	Motivo que reconoce	Ref.
Sec24	RE	ERGIC	Sar1	COP II	- FF - motivos dibásicos	1
p24 (p23)	TGN	RE	ARF	COP I	- KDEL - KKXX	2
AP-1 γ , β_1 , σ_1 , μ_1A	TGN, endosomas	Endosomas y membrana plasmática	ARF	Clatrina	- dileucina - tirosina - clatrina	3, 4, 5
AP-1B γ , β_1 , σ_1 , μ_1B	Isoforma específica de epitelios, TGN	Localización basolateral	ARF	Clatrina	- tirosina - dileucina	3, 4
AP-2 α , β_2 , σ_2 , μ_2	Membrana plasmática	Internalización	ARF	Clatrina	- dileucina - tirosina - clatrina	3, 4, 5
AP-3 δ , β_3A , σ_3 , μ_3^a	TGN, endosomas	Localización endosomal/ lisosomal	ARF	ζ Clatrina?	- tirosina - ζ dileucina?	3, 4, 5
AP-3B δ , β_3B , σ_3 , μ_3B	Isoforma específica de neuronas, TGN	Biogénesis de vesículas a partir de endosomas	ARF	Clatrina		4
AP-4 ϵ , β_4 , σ_4 , μ_4	TGN, endosomas	Localización endosomal / lisosomal y basolateral	ARF	Clatrina	Tirosina	3, 4, 5
GGA	Aparato de Golgi	Transporte a lisosomas.	ARF	Clatrina	Dileucina	4, 5

1. Schekman & Orci, 1996

2. Kaiser, 2000

3. Rohn *et al*, 2000

4. Nakatsu & Ohno, 2003

5. Bonifacino & Traub, 2003

Se conocen cuatro tipos de complejos AP, cada complejo consta de cuatro subunidades: dos grandes de aproximadamente 100-140 kD ($\gamma, \alpha, \delta, \epsilon$, y $\beta 1-4$ respectivamente), una mediana de 50kD (μ) y una pequeña de 20kD (σ) [Nakatsu & Ohno, 2003].

La proteína GGA es otra proteína adaptadora que se localiza en la TGN y participa en el tráfico hacia endosomas tempranos; a diferencia de los complejos AP, ésta es una sola proteína monomérica cuya estructura tiene cuatro dominios y es capaz de unirse a la GTPasa ARF [Bonifacino & Traub, 2003].

El tipo de motivos de localización que reconocen los complejos de AP y GGA se han comenzado a definir durante la última década. Los motivos basados en tirosina (YXX ϕ) o dileucina [DE]XXX[LI] se han caracterizado como blancos de estos complejos proteicos [Bonifacino & Traub, 2003].

Los motivos de dileucina [DE]XXX[LI] y DXXLL regulan la internalización y dirección hacia los endosomas y lisosomas; por la distribución de los complejos AP se reconocen tanto en la membrana plasmática como en los endosomas y la TGN [Letourneau & Klausner, 1992].

1.2.4 *Motivos de localización endosomal-lisosomal y basolateral*

Varios de los motivos que dirigen las proteínas hacia los endosomas y los lisosomas se encuentran en el dominio citosólico de las proteínas transmembranales. Los motivos presentan residuos voluminosos, hidrofóbicos, o con carga y son determinantes en la especificidad de esas señales (Tabla 1.2). Dos de los principales motivos de localización en los endosomas y los lisosomas tienen tirosina o dos leucinas consecutivas (Tabla 1.4). Estas secuencias contemplan las interacciones que existen en los dominios de reconocimiento péptido-motivo (proteínas adaptadoras-motivos), y que son características en la maquinaria de señalización endocítica y hacia los lisosomas [Bonifacino & Traub, 2003].

Los motivos de dileucina se identificaron al estudiar las señales de internalización basadas en tirosinas que dirigían las proteínas hacia lisosomas o a endocitosis. Sin embargo, se observó que en algunos casos, aunque la proteína de interés no tenía residuos de tirosina, ésta se internalizaba rápidamente y se dirigía a los lisosomas. Análisis posteriores revelaron que un segmento que contenía la secuencia DKQTLL era la responsable del tráfico a lisosomas y, además, que ambos residuos de leucina eran necesarios. Finalmente, se dedujo que el residuo ácido también es importante en el motivo. De esta forma se obtuvieron los motivos [DE]XXXL[LI] y DXXLL [Letourneau & Klausner, 1992].

Tabla 1.4

Motivos de localización hacia los complejos endosomas/lisosomas basados en tirosina y dileucina

Tipo de señal	Funciones	Referencia
Asn-Pro-X-Tyr NPXY	Internalización.	Chen <i>et al</i> , 1990; Bonifacino & Traub, 2003.
Tyr-X-X-Φ YXXΦ	Internalización hacia TGN, localización lisosomal y basolateral.	Breitfeld <i>et al</i> , 1990; Jadot <i>et al</i> , 1992; Bonifacino & Traub, 2003.
Asp-Glu-X-X-X-Leu-Leu-Ile [DE]XXXL[LI]	Internalización, localización lisosomal y basolateral.	Letourneur & Klausner, 1992; Pond <i>et al</i> , 1995; Miranda <i>et al</i> , 2001; Bonifacino & Traub, 2003.
Asp-X-X-Leu-Leu DXXLL	Clasificar las proteínas de TGN a endosomas.	Johnson & Kornfeld 1992; Chen <i>et al</i> , 1997; Bonifacino & Traub, 2003.

Φ representa un residuo de aminoácido con cadena lateral hidrofóbica.

Las secuencias [DE]XXXL[LI] se encuentran ampliamente distribuidas en proteínas de animales, protozoarios, *C. elegans*, tripanosomas y levaduras. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina de *S. cerevisiae* tiene un motivo de dileucina [DE]XXXL[LI] hacia vacuolas (equivalente a lisosomas en levaduras). Estos motivos en proteínas de mamíferos regulan rápidamente la internalización y tráfico a endosomas y lisosomas, sugiriendo con ello que pueden ser reconocidas tanto al nivel de la membrana plasmática como en los organelos intracelulares [Bonifacino & Traub, 2003].

Los motivos [DE]XXXL[LI] son reconocidos por los complejos de proteínas adaptadoras AP y GGA, y utilizan el mecanismo descrito en el subtema anterior, para introducir sus proteínas cargo en vesículas cubiertas de clatrina. Las proteínas con un motivo de dileucina que se encuentran en la membrana plasmática son reconocidas por las AP2, mientras que las proteínas de la TGN interactúan con la AP1 o AP3. Los motivos DXXLL interaccionan con las GGA, para viajar del aparato de Golgi a los lisosomas.

En la tabla 1.5 se muestran algunas proteínas cuyo tráfico hacia endosomas o internalización está regulado por un motivo de dileucina.

Tabla 1.5

Tráfico de distintas proteínas regulado por un motivo dileucina

Función del motivo de dileucina	Referencia
Internalización y localización del transportador de acetilcolina en las vesículas sinápticas	Colgan <i>et al</i> , 2007
Regulación el tráfico del receptor de Manosa-6-fosfato (desde TGN hacia endosomas tardíos)	Tortorella <i>et al</i> , 2007
Endocitosis desde la membrana plasmática hacia endosomas/lisosomas de GLUT8 (NH2-terminal)	Augustin <i>et al</i> , 2005
Asociación de una glicoproteína de cubierta del VIH con la proteína adaptadora de clatrina AP-1 (expresión en la membrana plasmática)	Wyss <i>et al</i> , 2001
Participa en la interacción de AP-1 con varias proteínas, como CD4, CD3 γ , receptor $\alpha\beta$ -CD3, FcR2-B2 y el lentiviral Nef	Heilker <i>et al</i> , 1999; Greenberg <i>et al</i> , 1998; Bresnahan <i>et al</i> , 1998
Asociación de una proteína de cubierta del VIH con la proteína adaptadora AP-2 (endocitosis dependiente de clatrina)	Byland <i>et al</i> , 2007

De igual forma, las secuencias que conforman los motivos de dileucina, en particular [DE]XXXL[LI], han sido relacionadas con la localización basolateral en las células epiteliales (células polarizadas) [Bonifacino & Traub, 2003; Matter *et al*, 1994].

En 1994 el grupo de Kart Matter determinó que el transporte basolateral y la endocitosis dependía de un motivo común de tirosina o dileucina y además, que los aminoácidos adyacentes en estos motivos determinan si el motivo favorece la endocitosis, la localización basolateral o ambas. Sus estudios se realizaron con lipoproteínas de baja densidad (LDL) y receptores de la fracción constante de anticuerpos (Fc), en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells). Además de observar el efecto de las dos leucinas, se demostró que la presencia de uno a tres residuos de aminoácidos ácidos es importante para la localización basolateral más que para la endocitosis. Por ejemplo, el receptor de la fracción Fc de IgG, presente en los macrófagos de ratón, tiene un motivo de dileucina que origina la localización basolateral y la endocitosis del receptor en las células MDCK [Matter *et al*, 1994; Hunziker & Fumey, 1994].

Otro tipo de proteínas que presentan este motivo de dileucina son: E-caderina, la proteína mayoritaria presente en las unión adherentes de células epiteliales, con una función importante en las uniones célula-célula y la polaridad de las células, donde el motivo la dirige hacia la superficie basolateral en las células MDCK [Miranda *et al*, 2001]; la acuaporina-3, éste es un

canal de agua presente en las células de los túbulos colectores del epitelio renal, cuya localización basolateral depende de un motivo de dileucina en combinación con un motivo de tirosina [Rai *et al*, 2006]. En la tabla 1.6 se muestran algunas proteínas que presentan un motivo de dileucina que origina una localización basolateral.

Tabla 1.6

Proteínas de localización basolateral dependiente de un motivo dileucina.

Proteína	Referencia
Receptor de la fracción Fc IgG de macrófagos de ratón (también endocitosis)	Matter <i>et al</i> , 1994, Hunziker & Fumey, 1994
Receptor neonatal Fc	Newton <i>et al</i> , 2005
E-caderina, uniones adherentes de células epiteliales.	Miranda <i>et al</i> , 2001
Acuaporina 3, túbulos colectores del epitelio renal.	Rai <i>et al</i> , 2006
Glicoproteína Lutheran, antígeno de grupo sanguíneo y molécula de adhesión celular, expresado en eritrocitos y en gran cantidad de tejidos (polarizado en células epiteliales)	El Nemer <i>et al</i> , 1999

La exactitud en la secuencia de aminoácidos de los motivos del tipo [DE]XXX[LI], DXXLL o LL, es importante para que puedan ser reconocidos por los complejos AP y seguir el tráfico hacia su destino. Si la localización de las proteínas depende únicamente de la presencia de un motivo de dileucina, cuando se mutan sus residuos de aminoácidos se evita el correcto reconocimiento por la maquinaria del transporte de proteínas, la proteína se localiza incorrectamente y no se lleva a cabo su función. Si esto ocurre puede originar un problema en la fisiología sistémica del organismo. Estas mutaciones pueden ser de carácter hereditario o no. Algunos padecimientos como la Enfermedad de Menkes [Menkes *et al*, 1962; Kaler, 1998; Francis *et al*, 1999] o el Albinismo [Simmen, 1999; Theos, 2005] son consecuencia de una mutación en un motivo de dileucina, que afecta la internalización o localización lisosomal de proteínas, respectivamente.

El canal de potasio GIRK5, endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, tiene en su región amino terminal la secuencia LYESPQLIQ, que corresponde a un motivo de dileucina de tipo [DE]XXXL[LI]. Conociendo además que el ovocito de *Xenopus laevis* es una célula polarizada, se espera que dicha secuencia sea un motivo que participe en la localización intracelular del canal GIRK5.

1.3 El ovocito de *Xenopus laevis*, una célula polarizada

Durante mucho tiempo los ovocitos de *X. laevis* se han utilizado ampliamente en la investigación biológica y farmacológica; se emplean como sistemas de expresión heteróloga de receptores, proteínas de transporte y canales iónicos. Sin embargo, no se contempla como modelo de células polarizadas y poco se ha estudiado al respecto.

Los ovocitos de *X. laevis* contienen ARNs y proteínas maternas que son necesarias para la proliferación celular después de la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Una gran subpoblación de estas moléculas endógenas se encuentran con una distribución polarizada a lo largo del eje animal-vegetal dentro del citoplasma del ovocito. En la corteza vegetal los ARN mensajeros contribuyen en la organización y mantenimiento de la red de citoqueratina [Kloc *et al*, 2001; King *et al*, 2005]. La polaridad a lo largo de estos polos se desarrolla durante el proceso de ovogénesis; se mantiene durante la maduración del ovocito, la fertilización y a rotación cortical requerida durante la transformación del hemisferio animal al ectodermo, del hemisferio vegetal al endodermo y células germinales y de la zona marginal al mesodermo. Como no se han descrito indicios de señales externas que determinen la polaridad, se considera que su desarrollo es una propiedad autónoma e intrínseca del ovocito [Kloc *et al*, 2001].

Los ovocitos son células que pasan por diferentes estadios hasta quedar arrestados en la profase de la primera meiosis. La localización de los organelos de los ovocitos de *X. laevis* es un proceso que cambia entre los distintos estadios de la ovogénesis (Fig. 1.12). En los primeros tres estadios el núcleo se encuentra sobre todo en el centro del ovocito y la densidad de los gránulos de yema del citoplasma es muy baja, lo cual permite que se pueda observar el interior celular por medio de estudios de microscopía confocal [Dumont, 1972]. Durante el desarrollo de los últimos estadios (IV, V y VI), aumenta la cantidad de yema, comienza a ocurrir una localización polarizada de los organelos, de algunas proteínas endógenas, proteínas del citoesqueleto, la pigmentación característica del polo animal [Dumont, 1972] y distintos ARN mensajeros se localizan preferentemente en uno de los polos [King *et al*, 2005; Kloc & Etkin, 2005].

En cuanto a los organelos el polo vegetal se observa casi carente de ellos, contiene un poco de la nube mitocondrial, el vitelo y el plasma germinal que originará las células germinales futuras [Dascal, 1997; Kloc, 2001]. El polo animal, por el contrario, presenta la vesícula germinal (núcleo), el retículo endoplásmico, los gránulos de pigmentación y de ahí se liberan los cuerpos polares durante el progreso meiótico [Merriam, 1983; Montanari, 2013]. Las proteínas de la red del citoesqueleto también son diferentes: los microtúbulos tiene su extremo negativo hacia la corteza del ovocito, partiendo de la vesícula germinal, los filamentos de actina se observan sobre

todo en la corteza de ambos polos, pero también dentro del nucleoplasma y de forma más ordenada en el polo animal; por último, los filamentos intermedios (queratina) también se observan en la corteza y en el espacio perinuclear en el polo vegetal (trabajos de D. Gard desde 1991, resumidos en Gard, 1999).

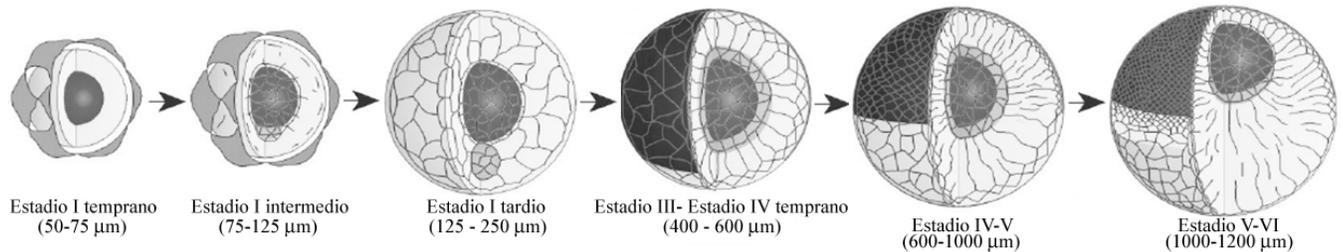


Figura 1.12 Ovogénesis de *X. laevis* (del estadio I al VI). Se observa el intervalo de tamaño en μm para los ovocitos desde el estadio I al VI. Además, los cambios en la red del citoesqueleto, la pigmentación externa la posición del núcleo y en la localización de los organelos [Gard, 1999].

En particular, en el estadio VI los filamentos intermedios tienen una red más densa en la corteza animal (casi del doble), con una organización más radial y con mayor profundidad en el citoplasma sub-cortical, que con respecto al polo vegetal (Fig. 1.13). Además, se describió también la presencia de una malla de filamentos intermedios que rodea el núcleo y se extiende por la zona perinuclear [Gard *et al.*, 1997; Gard, 1999].

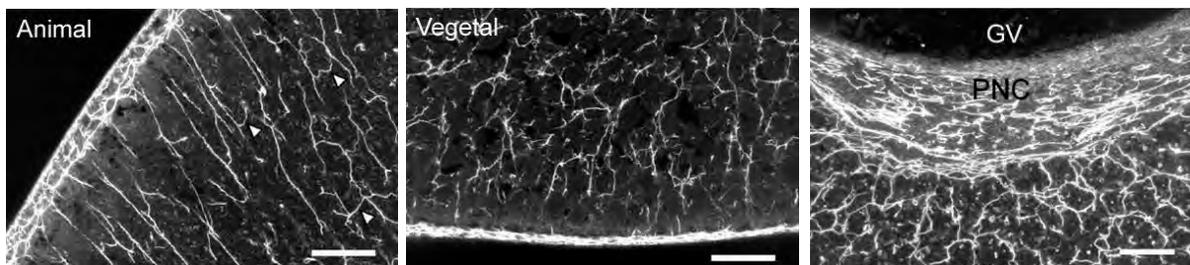


Figura 1.13 Localización de la red de filamentos intermedios en el ovocito de *X. laevis*. La imagen de la izquierda corresponde a la región de corteza animal, la del centro a la corteza vegetal, y en la de la derecha, GV denota al núcleo y PCN al espacio perinuclear [Gard, 1999].

Además de la distribución polarizada de organelos, ARNm y proteínas, en el ovocito de *X. laevis* existe también una asimetría en la distribución de compuestos inorgánicos, como iones o metales. Por ejemplo, el canal de cloro activado por Ca^{2+} [Machaca & Hartzell, 1998] y la bomba de Na^+/K^+ se encuentran enriquecidos en el polo animal. A pesar que no se conoce la función fisiológica exacta, para el canal de cloro, su concentración en un polo puede tener un papel en la exocitosis de los gránulos corticales para bloquear la polispermia [Kloc & Kubiak, 2014].

Varios metales se encuentran también distribuidos asimétricamente. Metales inorgánicos que forman los sitios activos de sensores redox, enzimas o factores de transcripción y que son indispensables para la función celular normal. El polo animal se encuentra enriquecido en hierro, zinc y cobre [Popescu *et al*, 2007], esto puede sugerir que el polo animal sirve como la reserva de los metales inorgánicos del futuro embrión [Kloc & Kubiak, 2014].

Desde el exterior es posible apreciar que los ovocitos se encuentran la mayor parte del tiempo con el polo animal hacia arriba [Fig. 1.14]; se ha discutido que esto puede ocurrir por dos razones: 1) por el peso de los gránulos de vitelo (yema), el vitelo es una mezcla de carbohidratos, lípidos y proteínas que se concentran en el polo vegetal y lo vuelve más denso [Montanari, 2013]; 2) para proteger el material genético, del núcleo, de la radiación UV, gracias a la ubicación de los gránulos con melanina en la corteza del polo animal [Stebbins & Cohen, 1995; Marco, 2003; Montanari, 2013].



Figura 1.14 Polaridad externa del ovocito de la rana *Xenopus laevis*. En la parte superior se observa el polo animal de color café oscuro y en la parte inferior se observa el polo vegetal de color amarillo pálido.

Esto en conjunto origina que los ovocitos *estadio VI* sean células polarizadas desde el interior hasta el exterior. Aunque su gran tamaño permite que sean células ideales para ciertos experimentos (p. ej. electrofisiología), al mismo tiempo impide el uso de microscopía de alta resolución para estudiar su organización intracelular en ovocitos enteros. La presencia del pigmento del polo animal y la alta densidad del polo vegetal, también dificultan la visualización del interior del ovocito más allá de la corteza celular [Terasaki *et al*, 2001] y para lograrlo se pueden llevar a cabo técnicas de blanqueamiento [Becker & Gard, 2005] o segmentaciones del ovocito.

Con estas técnicas de observación se logró observar con mayor detalle la distribución del retículo Endoplásmico. El RE está formado por túbulos de membranas y cisternas aplanadas, es la continuación de la envoltura nuclear y el espacio perinuclear. El uso de marcadores fluorescentes se había utilizado para observar el RE de los ovocitos de *Xenopus* desde la superficie de los ovocitos o en la corteza celular (Fig. 1.15) [Marchant *et al*, 2002]. Con el marcador ER-EYFP se logró determinar que también las lamelas anulares podían observarse [Terasaki *et al*, 2001].

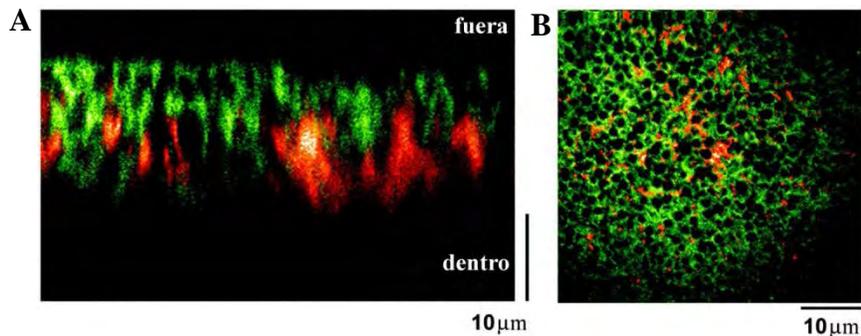


Figura 1.15 Marcaje del Retículo Endoplásmico (verde) con el marcador ER-EYFP en ovocitos de *X. laevis* estadio V-VI. A) Vista “de lado” (plano vertical) del hemisferio vegetal del ovocito, con la membrana plasmática hacia arriba (fuera) y el interior del ovocito hacia abajo (dentro). En rojo el marcador de mitocondrias dsRED. B) Vista en el plano horizontal de la misma sección que en A), donde se observa la mayor fluorescencia de ER-EYFP [Marchant *et al*, 2002].

Las lamelas (laminillas) anulares (LA) son estructuras poco estudiadas, aparecen como cisternas paralelas aplanadas, y pueden, o no, estar cruzadas longitudinalmente por anillos de proteínas (Fig. 1.16). Se encuentran en la periferia de la envoltura nuclear, del aparato de Golgi, en los centriolos, conectadas con los ribosomas en el RE rugoso y en el citoplasma de algunas células germinales [Kessel, 1968; Rosell, 2009]. Son abundantes en los gametos, células embrionarias y tumorales, aquellas que presentan una tasa alta de división celular [Lothhammer *et al*, 2009]. Las LA derivan del RE, están formadas por material membranal y proteínas, similares a las del RE y de los poros de la envoltura nuclear. Se cree que en el RE rugoso, las LA sintetizan las proteínas que forman los complejos del poro nuclear [Lothhammer *et al*, 2009].

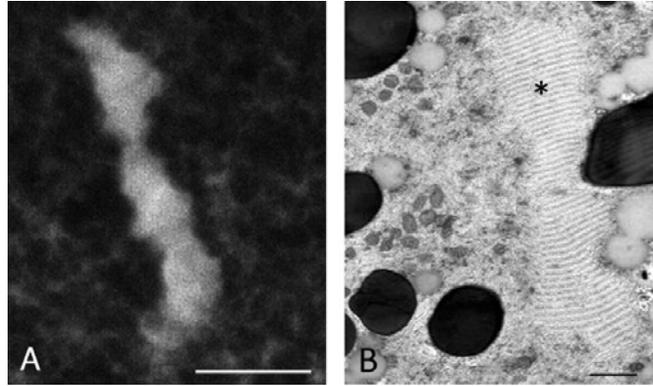


Figura 1.16 Lamela anular de ovocitos inmaduros (estadio VI). A) Isla de alta densidad identificada con el marcador fluorescente GFP-KDEL, localizada a $\sim 5 \mu\text{m}$ de la superficie celular. Escala: $10 \mu\text{m}$. B) Micrografía electrónica de una sección de la corteza donde se observa un organelo con apariencia característica de lamela anular. Escala: $1 \mu\text{m}$ [Terasaki *et al*, 2001].

Las LA se han encontrado en varios tipos de ovocitos [Rosell, 2009]. En los ovocitos desarrollados de la rana *pipiens* se encuentran principalmente en la corteza del polo animal, entre en núcleo y la membrana [Kessel, 1968]. En los ovocitos de *Xenopus* las LA se han descrito en el citoplasma y en la zona sub-cortical del polo animal, entre $5\text{-}20 \mu\text{m}$ de la membrana plasmática. Algo interesante es que la morfología de estas estructuras cambia entre los ovocitos inmaduros y los ovocitos maduros (Fig. 1.17); su forma en los ovocitos maduros parece más bien circular y no tan alargada como en las islas densas de los ovocitos inmaduros [Terasaki *et al*, 2001].

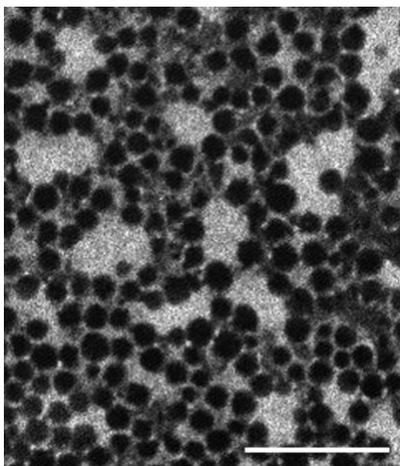


Figura 1.17 Magnificación del marcaje de RE en la corteza vegetal de los ovocitos maduros. Aparecen acumulaciones distribuidas por el citoplasma. Escala $10 \mu\text{m}$.

2. Antecedentes

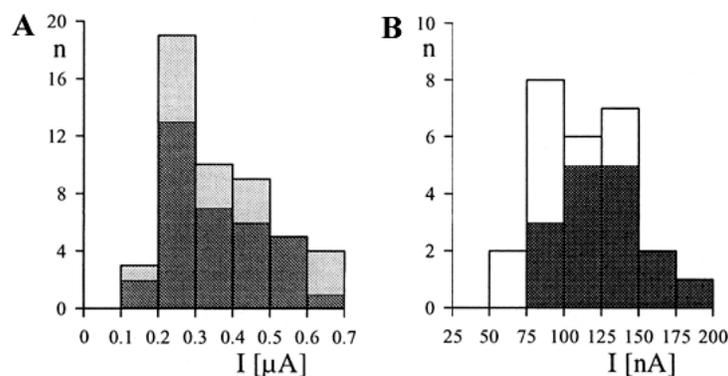


Figura 2.1 Distribución de frecuencias de la amplitud de la corriente rectificadora entrante. Se registraron cuatro lotes de ovocitos de ranas diferentes. A [μA]. Gris claro (16 ovocitos) registrados en marzo. Gris medio (34 ovocitos) registrados en mayo. B [nA]. Blanco (10 ovocitos) registrados en agosto. Gris oscuro (16 ovocitos) registrados en noviembre [Bauer *et al*, 1996].

Si se consideran el análisis realizado por Nakagawa *et al*, en el 2007, con un poco más de 10 mil genes en secuencias de eucariotes, procariotes, algunos vertebrados y mamíferos, puede observarse que la secuencia Kozak es sólo una de las secuencias preferentes, pero no es la única para tratar de predecir el inicio de la traducción de una proteína (Tabla 2.1). En el mismo estudio, con un análisis de cerca de 8 mil genes de *X. laevis* se observó que la secuencia A/GCA/T/CGCC/AAACATGGCG es la más favorecida para indicar el inicio de la traducción. Además, considerando para GIRK5 la presencia de varios uracilos alrededor del sitio -40, varias adeninas alrededor del sitio -15, una guanina en la posición -6 (desde el ATG), una adenina o guanina en la posición -3, una guanina en la posición +4 y una citosina en la posición +5, aparentemente el sitio más favorecido sería la isoforma GIRK5- $\Delta 5$.

Tabla 2.1

Secuencia amino terminal de las tres isoformas de GIRK5

Codón inicio (ATG)		Posición desde ATG								
		-50 a -30		-25 a -10		-9 a +6 (secuencia para <i>X.laevis</i>)				
		U-rich (T-rich)		A-rich		A/GCA/T/C	GCC/A	AAC	ATG	GCG
5'	1	ttttaggtatatacactgatag		gcatattcttatactg		aat	aca	aag	atg	att
5'	6	tgatagagagggcatattctta		gaataca aagatgatt		cct	gaa	aga	atg	gca
5'	26	gtcctcagtggaagattgt		gtcaccacaactcatc		caa	acc	atc	atg	gca

Los registros electrofisiológicos de las tres isoformas, en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*, muestran que sólo la isoforma más corta (GIRK5- Δ 25) es funcional y presenta corrientes rectificadoras entrantes (Fig. 2.2). Las isoformas GIRK5 y GIRK5- Δ 5 no presentaron un nivel de corriente superior al de los ovocitos control.

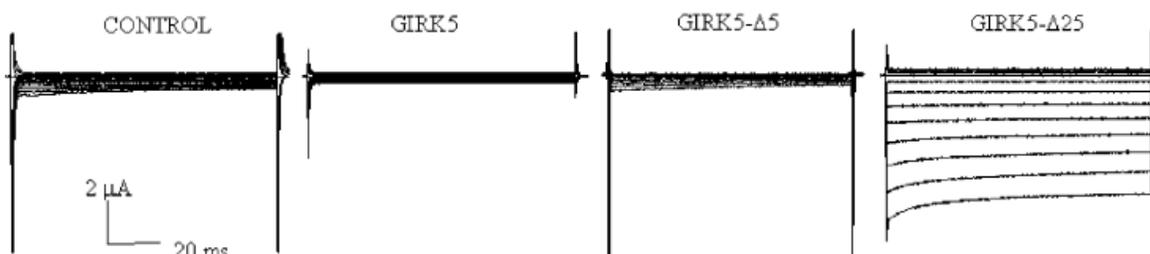


Figura 2.2 Registro de la corriente iónica de las isoformas del canal GIRK5 en ovocitos de *X. laevis*. Los ovocitos control se inyectaron con agua. El protocolo de pulsos de voltaje fue de -160 a 60 mV, con incrementos de 20 mV, durante 100 ms.

El canal GIRK5 tiene una tirosina en la posición 16 de la región amino terminal (Y16). El grupo de la Dra. Escobar determinó que la fosforilación de este residuo de tirosina es relevante para impedir la expresión funcional del canal en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*. Tanto la mutación del residuo por alanina (GIRK5-Y16A), como el uso de inhibidores de cinasas (geldanamicina), promueven la expresión funcional del canal GIRK5 (Fig. 2.3) [Mora & Escobar, 2005].

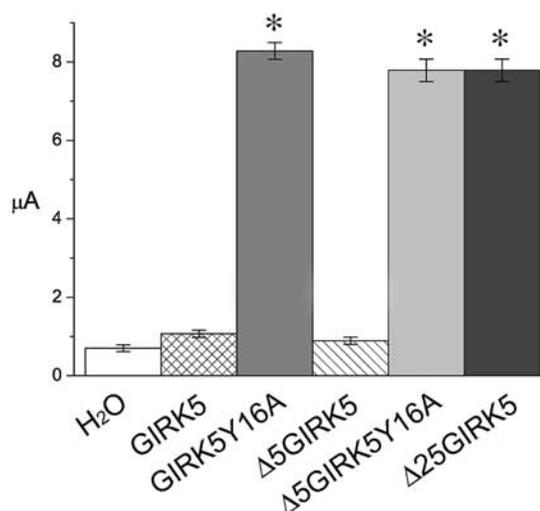


Figura 2.3 Corrientes entrantes normalizadas, de las isoformas de GIRK5, registradas a -160 mV. Se observa una corriente mayor (con respecto a los ovocitos control) en las isoformas que no presentan el residuo de tirosina 16: GIRK5Y16A, Δ 5GIRK5Y16A y Δ 25GIRK5.

Además, se realizaron proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente EGFP (Enhanced Green Florescent Protein); se determinó que la proteína quimérica EGFP-GIRK5 no era funcional y se encontraba sólo en la fracción membranal microsomal, mientras que la mutante EGFP-GIRK5Y16A sí era funcional y se encontraba en la membrana plasmática.

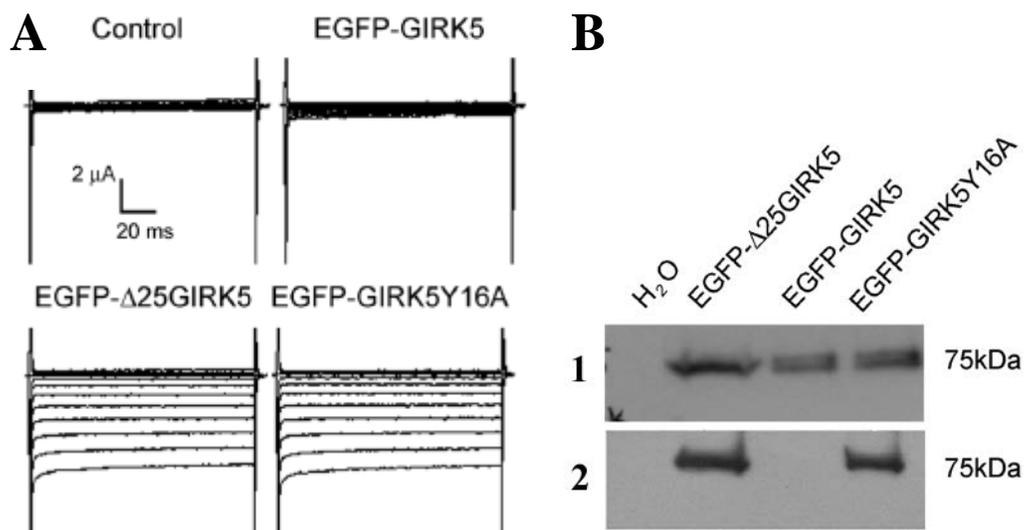


Figura 2.4 Expresión funcional de la proteína EGFP-GIRK5Y16A. **A.** Registros electrofisiológicos de las proteínas de fusión de dos isoformas de GIRK5 y la mutante GIRK5Y16A. **B.** Inmunodetección por Western blot de la fracción microsomal (1) y la fracción plasmática (2), de extractos membranales de ovocitos de *X. laevis* [Mora & Escobar, 2005].

La detección de EGFP-GIRK5 en la fracción microsomal de los extractos membranales, permitió comprobar que la proteína sí se sintetizaba pero no llegaba a la membrana plasmática (Fig. 2.4). La incubación con un inhibidor de cinasas de tirosina, PTK, permitió la localización de los canales EGFP-GIRK5 en la membrana plasmática, lo cual fue documentado por microscopía confocal y por Western blot (Fig. 2.5). Con el registro de los ovocitos incubados con geldanamicina, se determinó que el canal EGFP-GIRK5 no sólo llega a la membrana plasmática, sino que también es funcional.

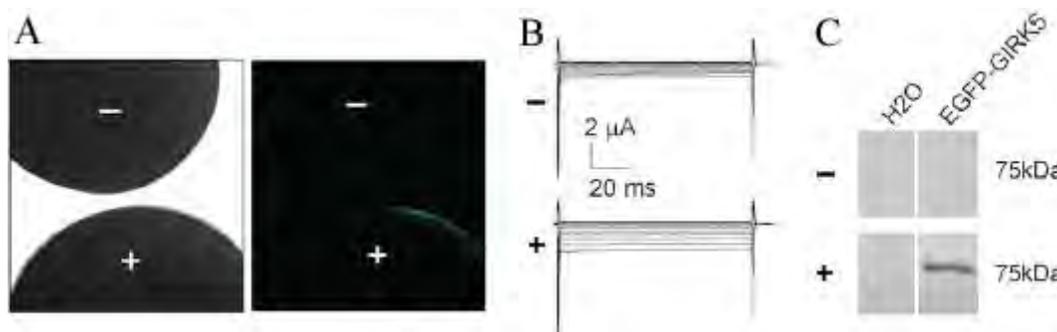


Figura 2.5 Expresión funcional de la proteína EGFP-GIRK5 por efecto de un inhibidor de cinasas de tirosina. Ovocitos incubados sin (-) y con (+) 75 nM de gentamicina durante 1 hora. **A** Microscopía confocal de la superficie de ovocitos de *X. laevis* inyectados con EGFP-GIRK5. **B** Registros electrofisiológicos de las corrientes entrantes de EGFP-GIRK5. **C** Inmunodetección por Western blot de la fracción plasmática de extractos membranales de ovocitos de *X. laevis* [Mora & Escobar, 2005]

A partir de estos resultados se decidió determinar la localización intracelular de las proteínas de fusión EGFP-GIRK5, EGFP- Δ 25GIRK5 y EGFP-GIRK5Y16A (Fig. 2.6). Un rasgo notable es que los ovocitos son células radialmente simétricas con dos polos: el animal (casquete oscuro) y el vegetal (casquete claro). La polaridad en la pigmentación es un reflejo de una polaridad interna mucho más compleja y la disposición de los organelos del ovocito está polarizada. La localización intracelular de las isoformas de GIRK5 se determinó en cortes sagitales de los ovocitos, para poder observar ambos polos (animal y vegetal), con microscopía confocal (Fig. 2.6). Se comprobó su peso molecular por Western blot. La proteína EGFP-GIRK5 se localizó puntualmente dentro de la célula, cercana a la estructura morfológica que corresponde al núcleo. La proteína EGFP- Δ 25GIRK5 se observó distribuida homogéneamente sobre el citoplasma (ambos polos) y también sobre la membrana plasmática. De forma interesante, la proteína EGFP-GIRK5Y16A se observó distribuida en el citoplasma y la membrana plasmática, pero localizada preferentemente en el polo vegetal [Díaz, 2007].

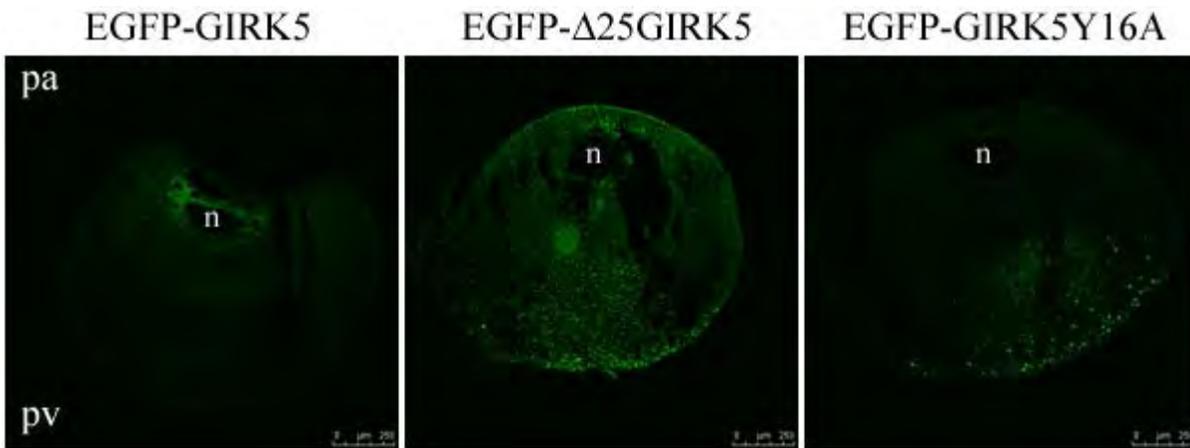


Figura 2.6 Localización intracelular de las proteínas de fusión EGFP-GIRK5, EGFP- Δ 25GIRK5 y EGFP-GIRK5Y16A. Cortes sagitales de los ovocitos de *X. laevis*, observados por microscopía confocal. Los ovocitos se encuentran orientados con el polo animal (pa) en la parte superior y el polo vegetal en la inferior (pv). El núcleo se ha identificado con (n).

De esta manera, con la ausencia o presencia de los primeros 25 aminoácidos del canal GIRK5 o la mutación en la tirosina 16, se observan distintas localizaciones intracelulares. Por lo tanto, la secuencia primaria de esta región amino terminal, puede contener motivos de localización, que participen en la retención o direccionamiento específico de los canales.

Aunque el ovocito de *X. laevis* no tiene una barrera física entre sus dos polos, la distribución de algunos canales iónicos no es uniforme sobre la membrana plasmática o el citoplasma de ambos polos. Se ha sugerido que estas variaciones incluso están relacionadas con el tipo de canal iónico o con el papel funcional de dichas proteínas [Stühmer, 1998].

En cuanto al papel del canal GIRK5, se observó durante la experimentación con las isoformas de GIRK5, que en algunas ocasiones cuando se inyectaban las isoformas funcionales (Δ 25GIRK5 y GIRK5-Y16A), los ovocitos maduraban de forma innata, sin necesidad de ser incubados con esteroides, y presentaban el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD), denotado por una mancha blanca en el polo animal.

De manera preliminar se realizó un ensayo donde se inyectó el ARNm de los canales GIRK5 y Δ 25GIRK5 a ovocitos, que se incubaron en una solución con progesterona 50 nM [Díaz, 2007]. Después de 48 horas se contaron los que tenían la GVBD y se obtuvieron los resultados de la tabla 2.2.

Tabla 2.2

Maduración de los ovocitos de *X. laevis* inyectados con dos isoformas del canales GIRK5

Muestra inyectada (n=20)	# ovocitos con GVBD	% de ovocitos con GVBD
Agua	1	5
GIRK5	1	5
GIRK5- Δ 25	15	75

Donde n = 20 ovocitos por cada muestra [Díaz, 2007].

Se observó que después de 48 horas, el 75% de los ovocitos inyectados con el canal funcional GIRK5- Δ 25, salió del estado arrestado para convertirse en ovocitos maduros (metafase - meiosis II). Por el contrario, los ovocitos inyectados con agua o con la isoforma que no llega a la membrana plasmática (GIRK5), no presentaron un porcentaje de maduración mayor al 5%.

Estos resultados preliminares sugieren que el canal GIRK5 funcional podría estar participando en el proceso de maduración de los ovocitos. Algunos canales sufren cambios en su localización durante el proceso de maduración para poder llevar a cabo correctamente su función [Müller *et al*, 1992, 1993; El-Jouni 2008]. Si el canal GIRK5-WT estuviera regulado de alguna manera para participar en la salida de la profase I, sería interesante observar si su localización se mantiene o sufre algún cambio.

3. Justificación

Los antecedentes mostrados ponen de manifiesto que la localización intracelular de las isoformas de GIRK5 es diferente entre sí y que la clave de dicha localización se encuentra en los primeros 25 aminoácidos del extremo amino terminal. Así, la localización de estas proteínas al interior del ovocito estadio VI, podría estar regulada por motivos de aminoácidos.

En la estructura primaria de la isoforma GIRK5, en los primeros 25 aminoácidos de la región amino terminal, se encuentra la secuencia **W12KRL**Y**ESP**Q**L**I**Q**. Esta secuencia tiene dos residuos básicos en las posiciones 13 (lisina) y 14 (arginina), **KR**, que podrían participar en la retención de la isoforma GIRK5-WT; aunque en este caso el motivo se encontraría seguido por una tirosina, algo no reportado en la literatura. Asimismo, a partir del residuo 17 el canal tiene un motivo de dileucina **EXXX**L**I**, que podría estar relacionado con la localización polarizada de la isoforma GIRK5-Y16A. Aunque no hay muchos estudios que abunden en la localización polarizada de proteínas en el ovocito de *Xenopus laevis*, sí se han descrito algunos casos donde la localización es crucial en el ovocito estadio VI para que se lleve a cabo el desarrollo correcto del embrión [Peter *et al*, 1991].

Se cree que el papel del canal GIRK5 en los ovocitos estadio VI de *Xenopus laevis* es participar en el establecimiento del potencial de membrana en reposo; sin embargo, dado que su expresión funcional se ha reportado variable con respecto a la época del año, y que la expresión de las isoformas funcionales de GIRK5, junto con la progesterona, aparentemente favorecen la progresión del ciclo celular a meiosis II, sería relevante conocer si tiene un papel adicional durante la maduración o la fertilización de los ovocitos [Bauer *et al*, 1996].

Sería de gran importancia determinar si las secuencias mencionadas del canal GIRK5, son las que participan en la regulación de su tráfico intracelular para determinar la localización y si ésta difiere dependiendo del estadio del ovocito; esto proporcionaría información para entender cómo el modelo del ovocito de *X. laevis* transporta sus proteínas y que un canal de K⁺ rectificador entrante podría estar relacionado con la maduración del ovocito.

4. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

- ✧ La localización específica de proteínas en los ovocitos de *Xenopus laevis* depende de motivos de aminoácidos presentes en la secuencia primaria de las proteínas.
 - Los residuos de lisina (K) y arginina (R), presentes en las posiciones 13 y 14 de la región amino terminal del canal de potasio GIRK5, participan en la retención intracelular del canal en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.
 - Los residuos de ácido glutámico (E), leucina (L) e isoleucina (I), presentes en las posiciones 17, 21 y 22, respectivamente, de la región amino terminal del canal de potasio GIRK5, corresponden a un motivo de dileucina **EXXXLI**, que determina la distribución polarizada del canal en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

- ✧ El canal GIRK5 está relacionado con la maduración de los ovocitos de *Xenopus laevis* y su localización es distinta en ovocitos de estadio VI y ovocitos maduros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar los motivos de tráfico del canal de potasio GIRK5, en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, y evaluar si hay cambios en la localización del canal relacionados con el estadio celular (estadio VI y ovocitos maduros).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar el organelo donde se encuentra retenido el canal GIRK5.
- Caracterizar los residuos de aminoácidos que participan en la localización intracelular de la isoforma GIRK5 (motivo retención).
- Caracterizar los residuos de aminoácidos que participan en la localización polarizada de la mutante GIRK5-Y16A (motivo polarización).
- Implementar una técnica para conocer la localización intracelular de los canales mutados por microscopía confocal.
- Establecer la localización intracelular del canal GIRK5, y sus mutantes, en ovocitos estadio VI y ovocitos maduros de *X. laevis*.

5. Metodología

De acuerdo con los objetivos particulares mencionados se enumera a continuación la metodología empleada. Más adelante se muestran con un diagrama de flujo la metodología seguida para realizar las mutaciones puntuales y por último se describe de forma detallada cada uno de los métodos. En las secciones del apéndice puede consultarse la formulación de las soluciones empleadas, los protocolos de PCR, de las reacciones de ligación y algunos resultados de la obtención de las mutantes.

- 1.- Identificar el organelo donde se encuentra retenido el canal GIRK5.
 - Subclonar un marcador fluorescente de Retículo Endoplásmico.
 - Obtener el ARNm.
 - Expresarlo junto con el ARNm del canal GIRK5-WT.
 - Observar por microscopía confocal.
- 2.- Realizar la mutación puntual del motivo KR, mutando los residuos de lisina 13 y arginina 14 por residuos de alanina, juntos y de forma individual.
- 3.- Realizar mutaciones puntuales de los residuos que forman parte del motivo de dileucina EXXXLI, por residuos de alanina, en los residuos de ácido glutámico 17, leucina 21 e isoleucina 22.
- 4.- Realizar proteínas de fusión con EGFP de las mutaciones realizadas.
 - Obtener el ARNm.
- 5.- Microinyectar el ARNm para expresar los canales mutados en los ovocitos.
- 6.- Mejorar la fijación con paraformaldehído de los ovocitos, mediante el cambio de PBS por ND96 y realizar cortes citológicos por congelación.
- 7.- Estudiar por microscopía confocal la localización de las proteínas de fusión.
 - Realizar la cuantificación de fluorescencia en cada polo de los ovocitos.
- 8.- Obtener ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* para determinar la localización intracelular de los canales quiméricos, por microscopía confocal.

▪ MUTACIONES PUNTUALES DEL CANAL GIRK5

De las tres isoformas descritas para el canal GIRK5, la isoforma GIRK5 es la que presenta el amino terminal más largo (canal completo); se denominó a este canal como la isoforma *Wild Type* (WT). En la figura 5.1 se puede observar el nombre abreviado de cada mutación originada, el lugar en la secuencia primaria donde se realizó la mutación puntual y los aminoácidos que se mutaron por el residuo de alanina.

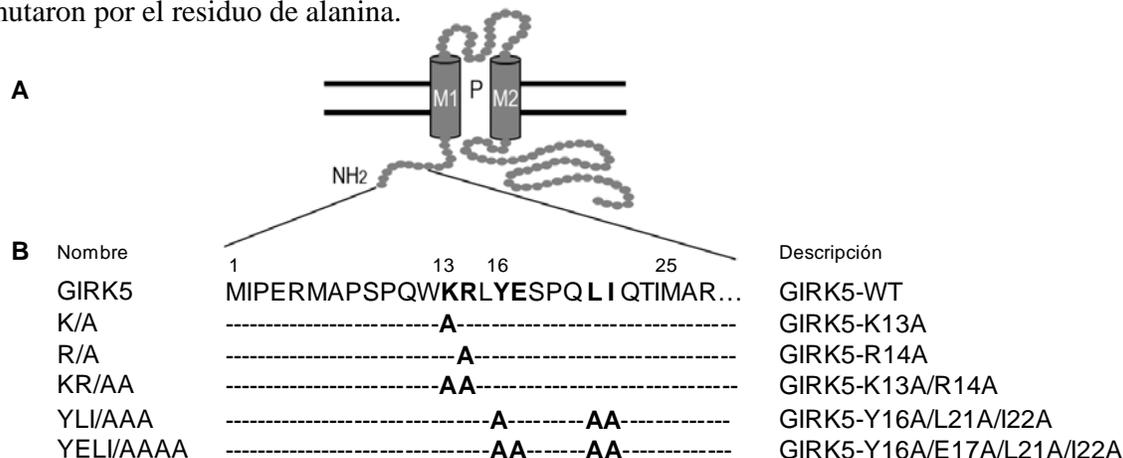


Figura 5.1 Mutaciones puntuales realizadas sobre la isoforma **GIRK5**. A) Esquema de la topología de una subunidad del canal GIRK5. B) Nombres abreviados de las mutantes realizadas, el sitio del amino terminal donde se llevó a cabo la mutación y la descripción de los aminoácidos mutados por alanina de cada mutante.

Generación de las mutaciones puntuales en la proteína GIRK5



- DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para obtener las mutaciones de los residuos de aminoácidos del canal GIRK5, se realizó el diseño de oligonucleótidos (iniciadores o cebadores) complementarios al canal y de aproximadamente 20 bases. Se diseñaron dos oligonucleótidos para cada mutante (sentido y antisentido); cada uno incluía una mutación codificante para un residuo de alanina en los residuos de lisina 13, arginina 14, tirosina 16, ácido glutámico 17, leucina 21, isoleucina 22 y sus combinaciones. En el apéndice ii se encuentra la lista de los pares de oligonucleótidos utilizados. La secuencia templado utilizada corresponde a la del canal GIRK5, a menos que se indique otra secuencia.

- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA Y RECOMBINACIÓN POR PCR

Con los cebadores diseñados se realizó la mutagénesis dirigida por PCR (Polimerase Chain Reaction). Para obtener las proteínas mutantes se utilizaron además distintos ADNc como hebra molde (apéndice ii, Tabla I).

En el laboratorio se contaba con dos iniciadores que acotaban la región requerida del ADN de las hebras molde, donde se llevó a cabo la mutación puntual: 'SP6 up' en el extremo 5' y 'Low 2' en el 3'. Para cada mutante se realizaron dos reacciones de PCR por separado, una para cada cebador mutado, denominados Low mut y Up mut (reacción 1 y reacción 2, respectivamente).

Una tercera reacción de PCR (PCR combinatoria) utilizó como moldes los fragmentos mutados (que se amplificaron en la primera y segunda reacción), junto con los cebadores 'SP6 Up' y 'Low2,' que acotan una región de aproximadamente 2000 pb. El proceso y las condiciones de las reacciones se pueden consultar en el apéndice.

- LIGACIÓN

Una vez amplificados los fragmentos mutados de aproximadamente 2000 pb, se llevó a cabo una digestión enzimática con endonucleasas, tanto de los fragmentos como del vector pBF que contenía el canal GIRK5. El ADN obtenido de la segunda PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, se realizó una extracción utilizando el kit PureLink Quick Gel Extraction de Invitrogen®. El DNA obtenido (35µL) y el vector para ovocitos PBF (10µg) se digirieron con la endonucleasa de restricción Nco-I para generar los mismos extremos cohesivos. El vector se trató con fosfatasa alcalina para evitar la recircularización del mismo. Ambas digestiones se separaron por

electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificaron las bandas correspondientes al fragmento mutado y al vector linearizado. La reacción de ligación, sus controles y un diagrama de la clonación del fragmento mutado en el vector pBF se puede encontrar en el apéndice iii.

- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Previamente se prepararon células competentes de la cepa *E.coli* DH5 α , con la técnica de rubidio [Maniatis *et al*, 1982]. Éstas se transformaron por choque térmico con el DNA obtenido de la ligación anterior. Para la transformación se utilizó medio de cultivo Luria Brot (LB) y una muestra de células sin transformar como control negativo. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar LB más ampicilina. Se incubaron entre 12-14 horas a 37 °C. Las bacterias que se transformaron correctamente con el plásmido presentaron resistencia a ampicilina.

- AMPLIFICACIÓN DEL ADNc *in vivo*

De las colonias que crecieron en las cajas de LB más ampicilina se seleccionaron 2 UFC aisladas, se sembraron en 5mL de medio LB con ampicilina y se incubaron durante 16-18hrs a 37 °C con agitación de 250 rpm. El ADN se obtuvo por lisis alcalina (Sambrook, *et al*, 1989). Se realizaron ensayos con endonucleasas de restricción, para comprobar que el tamaño de los fragmentos del DNA cortados correspondiera con los tamaños esperados. Se realizó una midipreparación utilizando el kit Max Prep (Qiagen). El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría con luz UV a una longitud de onda de 260nm.

- SUBCLONACIÓN DE UN MARCADOR FLUORESCENTE PARA RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

Se contaba con un marcador fluorescente de retículo endoplásmico, en el vector comercial ECFP-ER, ©Clontech. Se subclonó en el vector pBF la región codificante del marcador que consistía en la proteína de fluorescencia cian incrementada (ECFP), más el motivo de retención para retículo endoplásmico (ER) de tipo KDEL.

- OBTENCIÓN DEL ARNm

Se linearizó el plásmido que contiene el ADNc de interés utilizando lo correspondiente a 6 μ g de DNA y 2 μ L de la enzima de restricción Mlu-I para llegar a un volumen de reacción final de 20 μ L (con agua grado biología molecular), se incubó durante 3 horas a 37 °C y se comprobó posteriormente en un gel de agarosa 1%, que se haya linearizado el ADN; enseguida se

adicionaron 1 μL de EDTA 0.5 M, 2 μL de acetato de amonio y 44 μL de etanol 100%, se incubó toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, se centrifugó a 14000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y se recuperó el precipitado retirando el exceso de etanol; una vez seco se resuspende en 6 μL de agua grado biología molecular y se comprobó con 1 μL la presencia de DNA en un gel de agarosa 1%.

Una vez linearizado el ADNc se realizó la reacción de transcripción, se mezclaron 10 μL de nucleótidos trifosfatados (NTP/Cap) 2x, 2 μL de solución amortiguadora de reacción 10x, 5 μL de templado de DNA lineal, 2 μL de enzima SP6 y 1 μL de GTP; se incubó a 37°C durante 3 h.

Posteriormente se agregó 1 μL de ADNasa y se incubó 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar el ADN presente. Después, para detener la reacción y recuperar el ARN transcrito se adicionaron 30 μL de agua libre de nucleasas y 25 μL de cloruro de litio y se dejó precipitando a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Se centrifugó a 14000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y se recuperó el botón, éste se lava con 1mL de etanol al 70% y se centrifugó para eliminar todo el etanol. Se dejó secar el botón durante 10 minutos y se resuspendió el pellet en 20 μL de solución amortiguadora Tris-EDTA.

Para determinar la concentración del RNA se mezclaron 2 μL del ARNm recién preparado con 498 μL de agua destilada y se cuantificó por espectrofotometría, en una celda de cuarzo, a una longitud de onda de 260 nm.

▪ OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS

Se anestesia una hembra de la especie *Xenopus laevis* por hipotermia durante una hora; enseguida se realiza una ovariectomía parcial que consiste en realizar una pequeña incisión en la piel y el músculo en la zona del vientre de la rana aproximadamente un centímetro arriba del pliegue del anca. Se retiran los ovocitos y se colocan en solución ND96 sin calcio. La incisión de la rana se sutura y se deja en agua fría mientras se recupera de la anestesia. Los ovocitos obtenidos se colocan durante una hora en una solución de colagenasa 1.6 mg/mL con la finalidad de remover el saco vitelino de los mismos. Posteriormente se realizan 5 lavados de los ovocitos con medio ND96 sin calcio para remover la colagenasa, 5 lavados con medio ND96 con calcio y por último 5 con medio ND96 con calcio y gentamicina para preservarlos a 18°C y evitar su contaminación.

- **MICROINYECCIÓN DE LOS OVOCITOS**

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

- **CORTES CITOLÓGICOS**

Los ovocitos inyectados con el ARNm de las quimeras de EGFP-GIRK5 se dejan expresando entre 4-6 días a 18° C, en medio ND96. Pasado ese tiempo, los ovocitos se incuban en una solución de ND96 con paraformaldehído al 2% durante 10 min, después se sumergen los tejidos en una solución de paraformaldehído al 2% más sacarosa al 30%, se mantienen en oscuridad y a 4° C.

Se realizan cortes sagitales del ovocito con ayuda de un criostato (Leica CM1100). Los ovocitos se cubren con medio de congelamiento Tissue-Tek ® (alcohol polivinílico 10.24% y glicol polietileno 4.26%) y se congelan, una vez que se alcanza la temperatura de -25 °C se realizan cortes seriales de 10 µm de espesor y se colocan sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Las preparaciones se montan con VECTASHIELD® (Vector laboratories, CA, EUA) para conservar su fluorescencia.

- **MICROSCOPIA CONFOCAL**

Los cortes se observaron en el microscopio confocal (LEICA TCS SP5), para la proteína verde fluorescente (EGFP) se utilizó un láser de argón con una frecuencia de emisión de 488 nm y de detección entre 500 nm y 544 nm; y para ECFP con una frecuencia de emisión de 458nm y detección entre 473 nm y 524 nm. Las muestras se observaron en seco utilizando un objetivo 10.0x y 40x en la sección media de cada ovocito.

En las muestras que contienen tanto ECFP-ER como EGFP-GIRK5, las imágenes de marcaje se adquirieron de forma subsecuente para disminuir el cruce de los dos canales (EGFP y ECFP). La emisión se detectó entre 496 – 530 nm, para EGFP y entre 460 - 495 nm para ECFP. La fluorescencia de ECFP-ER se definió en color rojo para poder superponer las imágenes y

observar fácilmente si existía una co-localización. Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 8 bits (255 niveles de gris por píxel). La densidad de los píxeles fue de 4.36×10^5 pix/mm².

▪ CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA

La cantidad de fluorescencia se estimó con el software del microscopio confocal 'Leica Application Suite: Advanced Fluorescence Lite 2.6.0'. Se seleccionaron regiones de interés (ROI) para delimitar el polo animal y el polo vegetal. Para comparar la distribución de la intensidad de fluorescencia (proteínas quiméricas), entre las regiones ROI de ambos polos, se calculó la intensidad de fluorescencia relativa; ésta se obtuvo al dividir la intensidad de fluorescencia de un polo entre la fluorescencia total del ovocito. Se utilizaron ovocitos sin inyectar como control; la fluorescencia por debajo de un nivel de gris 50 se consideró autofluorescencia y se restó de los ovocitos inyectados con ARNm. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por t-Student y ANOVA de una vía.

▪ MADURACIÓN *IN VITRO*

Se realizó la microinyección de los ovocitos estadio VI con el ARNm de interés. Se incubaron durante 48 horas en medio ND96, a 18 °C, para permitir la traducción de los canales. Posteriormente se adicionó progesterona al medio en una concentración de 75 nM y se dejaron incubar durante 24 h. Posterior a ese tiempo, se retiraron los ovocitos muertos y se seleccionaron aquellos que presentaban una mancha blanca en el polo animal, la cual correspondía al rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) y es un indicador de los ovocitos maduros (arresto en metafase II). Se seleccionan algunos ovocitos al azar y se cortan por la mitad para verificar la ausencia del núcleo.

▪ WESTERN-BLOT

Se realizó la microinyección de los ovocitos estadio VI con el ARNm de interés. Una vez cumplido el tiempo de expresión del ARNm, se homogenizan de 10 a 20 ovocitos en solución amortiguadora de lisis utilizando 2 µL por ovocito y pasándolos 20 veces por una aguja de 30G. Los homogenizados se centrifugan por duplicado a 4000g durante 10 minutos a 4° C para remover la fracción correspondiente a yema y núcleo. El sobrenadante contiene las membranas totales.

Una vez separadas las membranas de interés, se mezcla el sobrenadante con volúmenes iguales de la solución amortiguadora de carga (Laemmli). Se calientan las muestras a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se carga lo equivalente a 8 ovocitos en un gel de poliacrilamida al 10 % y se corre a 70 V (gel concentrador) y 110 V (gel separador).

Terminada la electroforesis se realiza la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, La membrana, geles y las toallas se sumergen durante 10 minutos en solución amortiguadora de transferencia. Se coloca en la celda de transferencia una toalla, la membrana, el gel y otra toalla. La transferencia se realiza a 20 V durante una hora.

Se bloquea la membrana con TBS más 5% de leche, a 4 °C toda la noche. Los geles se dejan en solución de tñido toda la noche y se destiñen para comprobar la eficiencia de la transferencia. Se enjuagan las membranas con solución de transferencia TBS-Tween al 0.1% (TBS-T) y se incuba con 1.5 mL de solución de anticuerpo primario 1:1000 (TBS-T con 1% de albumina sérica bovina -BSA- y leche al 5 %) durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se realizan 2 lavados de 5 minutos y 3 lavados de 10 minutos con solución amortiguadora TBS-T.

Se dejan incubando las membranas con 1.5 mL de solución de anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa 1:5000 durante una hora a temperatura ambiente. Se realizan 2 lavados de 5 minutos y 3 lavados de 10 minutos con solución amortiguadora TBS-Tween. Para la detección se utiliza el kit de Amersham-Plus (ECL-plus) y se revela por autorradiografía en placas para rayos X.

6. Resultados y discusión

6.1. Localización del retículo endoplásmico en el polo animal de los ovocitos de *X. laevis*

El RE de los ovocitos de *X. laevis* se había estudiado con diversas metodologías: identificación en extractos por fraccionamiento celular [Ceriotti & Colman, 1988; Deshler *et al*, 1997]; inmunodetección en estadios I-IV [Deshler *et al*, 1997; Kloc & Etkin, 1998], microscopía electrónica en ovocitos deshidratados, estadio I-VI y maduros [Terasaki *et al*, 2001]; microscopía confocal en ovocitos vivos de estadios I-III [Chang *et al*, 2004]; y estudios de co-localización con marcadores fluorescentes por microscopía confocal en ovocitos estadio VI [Marchant *et al*, 2002; Grasser *et al*, 2008]. Sin embargo, no se contaba con una imagen que mostrara al mismo tiempo la distribución, a través del ovocito, en los polos animal y vegetal.

Para obtener el marcaje del RE se utilizó el marcador fluorescente ECFP-ER, que contiene los motivos de la calreticulina en su amino terminal y un motivo KDEL hacia su carboxilo terminal; estas secuencias son características de las proteínas que residen en el RE. Como control negativo se utilizaron ovocitos sin inyectar (Fig. 6.1) y se ajustaron los parámetros del microscopio confocal para filtrar la autofluorescencia. En los resultados de microscopía confocal, se logró observar en una sola imagen, la localización subcelular a lo largo de ambos polos del ovocito de *X. laevis*, estadio VI (Fig. 6.2).

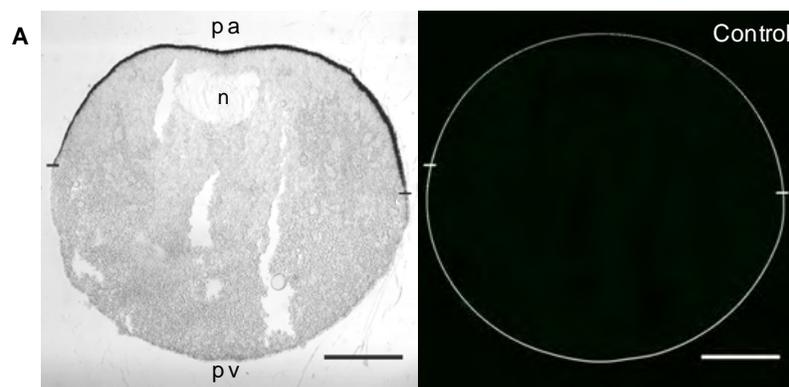


Figura 6.1 Control negativo. Izquierda, imagen de campo claro; derecha imagen de microscopía confocal. **A)** Ovocito sin inyectar. Polo animal (pa) en la parte superior, polo vegetal (pv) en la parte inferior. Las líneas blancas pequeñas indican la separación entre los polos, el círculo blanco indica digitalmente el límite del ovocito. Objetivo 10X, escala: 250 μm .

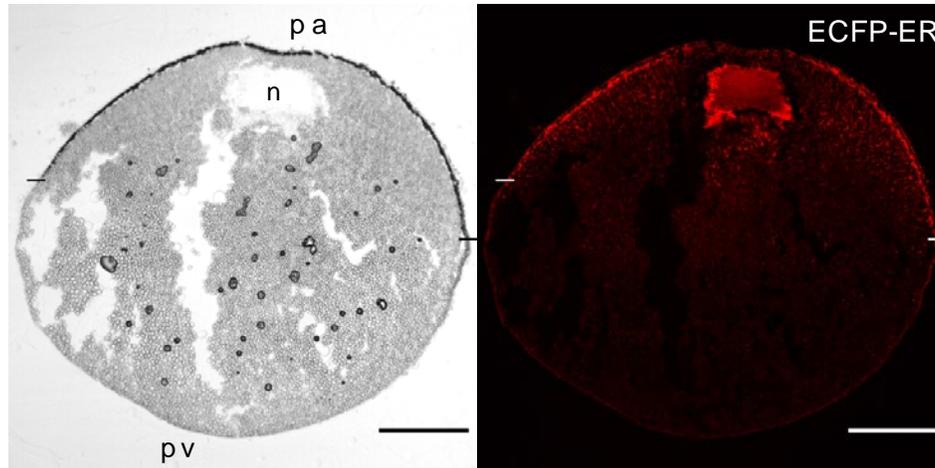


Figura 6.2 Localización del retículo endoplásmico en un ovocito de *X. laevis*, estadio VI. Vista completa del ovocito, polo animal (pa) en la parte superior, polo vegetal (pv) en la parte inferior, el núcleo (n) y la separación entre ambos polos está indicada con una línea pequeña. **A)** campo claro y **B)** microscopía confocal; en rojo, el marcador ECFP-ER alrededor del núcleo y predominantemente en el polo animal. Objetivo 10X. Escala 250 μ m.

Los resultados de microscopía confocal con el marcador ECFP-ER confirman la localización del retículo endoplásmico preferentemente en el polo animal (objetivo 10X, Fig. 6.2). Su localización se observó alrededor de la vesícula germinal (núcleo), en el espacio perinuclear, la corteza del polo animal y con prolongaciones hacia la membrana plasmática (Fig. 6.3).

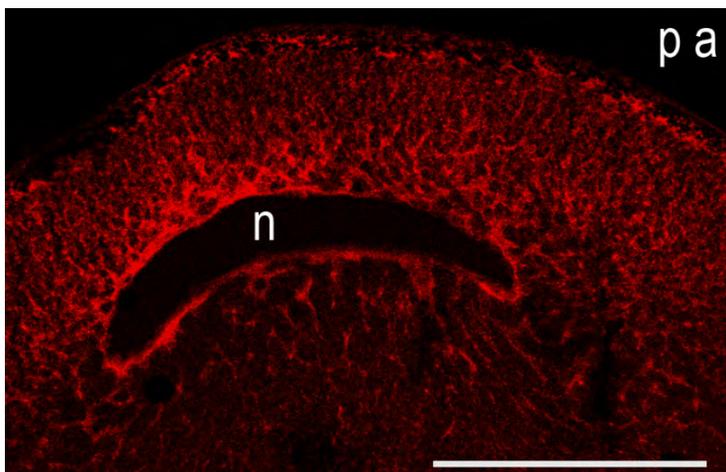


Figura 6.3 Localización del retículo endoplásmico en el polo animal (pa). En rojo, ECFP-ER. Vista del RE desde el núcleo (n) hacia la corteza y la membrana celular. Objetivo 10X. Escala: 250 μ m.

En un acercamiento al polo animal (Fig. 6.3) se observa que el RE delimita un espacio “vacío” que corresponde al núcleo, y a partir de él se observa una formación que se distribuye hacia la corteza del ovocito, hasta llegar debajo de la membrana plasmática. En estos resultados el RE se observa en estructuras morfológicas de tipo reticular (debajo del núcleo), pero también algunas con apariencia de islas densas y alargadas (en la corteza entre la membrana celular y el núcleo), que coinciden con lo reportado por Terasaki *et al* en 2001, para el marcaje de las lamelas anulares. Para ese reporte, se utilizó un marcador de RE con la secuencia KDEL, con esta construcción se observó por microscopía confocal que también se marcaban las lamelas anulares.

En las imágenes obtenidas con el marcador ECFP-ER en los ovocitos de *X. laevis*, se observan varias estructuras con forma de islas pequeñas con fluorescencia (Fig. 6.3 y 6.4), que se encuentran con la localización típica descrita para las lamelas anulares (LA) en los ovocitos. Un acercamiento a esta zona, en una micrografía de la corteza animal, muestra varias estructuras que por morfología y tamaño podrían corresponder con dichas estructuras, presentes desde la corteza y hacia el interior del ovocito en la región del polo animal.

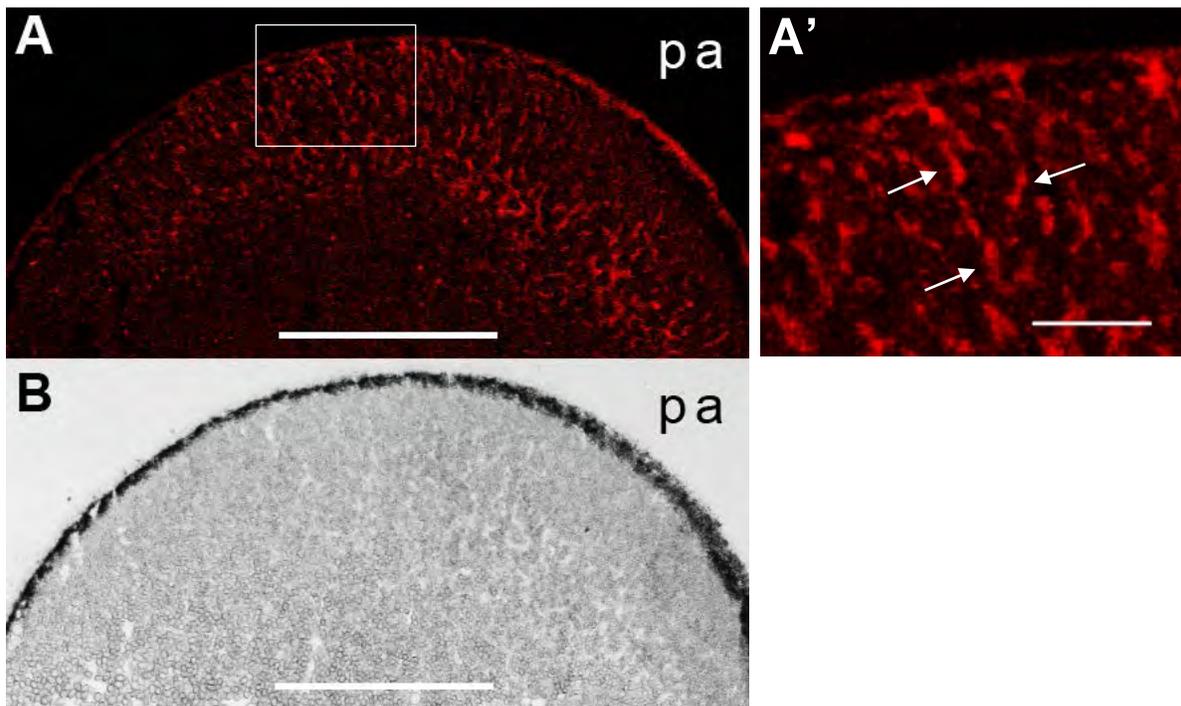


Figura 6.4 Identificación de posibles lamelas celulares, en la corteza del polo animal, del ovocito de *X. laevis*. A) Microscopía confocal del polo animal (pa), en rojo el marcador ECFP-ER, B) Microscopía de campo claro. Objetivo 10X. Escala: 250 μm ., A') aumento digital de la zona delimitada en A, con probables lamelas anulares señaladas con las flechas blancas. Escala: 50 μm .

Sin embargo, esta localización del marcador ECFP-ER también podría corresponder con la ubicación del RE en la red del citoesqueleto. Desde 1986, el grupo de K. Fugiwara reportó la relación del RE con el citoesqueleto en células epiteliales, en particular, con los microtúbulos como estructuras interdependientes [Terasaki *et al*, 1986]. Después, en 1992, Soltys & Gupta reportaron la interrelación del RE también con los filamentos intermedios. Posteriormente, se realizaron estudios de la red de citoesqueleto (filamentos intermedios, actina y microtúbulos), donde se observa la polarización del mismo en los ovocitos de *X. laevis*.

Los resultados obtenidos para el marcaje del RE también parecen tener una distribución en la corteza del polo animal y debajo del núcleo, como se describe para la localización de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Por lo tanto, el marcador ECFP-ER permite identificar el espacio perinuclear, el RE y probablemente las lamelas celulares en los ovocitos de *X. laevis* estadio VI.

El uso de construcciones moleculares, compuestas por marcadores fluorescentes más motivos de localización de organelos (como RE, aparato de Golgi o mitocondrias), es una técnica común de la biología molecular; estos marcadores expresados en los ovocitos de *X. laevis* de forma heteróloga permiten: 1) marcar efectivamente los organelos intracelulares con una menor manipulación (comparada con inmunodetecciones) y 2) son relevantes para poner de manifiesto algo, que aunque es evidente, no se ha discutido a profundidad: que el transporte de proteínas dentro del ovocito de *X. laevis* comparte el mismo tipo de señales de localización de proteínas reguladas por motivos de aminoácidos.

Y esto no ocurre sólo para *X. laevis*, el marcador GFP-KDEL, también se ha localizado en el RE de otros ovocitos que no son de mamíferos, como en la estrella y el erizo de mar [Terasaki *et al*, 1996; Terasaki, 2000]. Desde la década de los 90's se demostró que la localización de proteínas en el retículo endoplásmico del ovocito de *X. laevis* compartía estas señales, descritas para la localización en el RE en otras células, pero se observó que aunque a final de cuentas la localización era la misma, ésta podía ocurrir por mecanismos no compatibles o no descritos a la fecha.

Por lo tanto es probable que las señales y gran parte de la maquinaria de tráfico y sus mecanismos de transporte estén compartidos entre células diferentes como los ovocitos y las células epiteliales, donde se ha estudiado más el transporte de proteínas. Sin embargo, es probable que los ovocitos cuenten con proteínas específicas que regulen su tráfico de forma particular. Algo que hasta la fecha no ha sido muy estudiado, pues el ovocito de *Xenopus laevis* no se considera una célula ideal para estudiar estos procesos, sin embargo, la facilidad con que puede expresar proteínas exógenas, su gran tamaño y su estudio por diversas técnicas (microscopía, biología molecular, bioquímica, biofísica, etc.), podría cambiar a futuro, permitiendo conocer más sobre su fisiología celular y el tráfico de proteínas.

6.2. Localización del canal GIRK5-WT en el RE y espacio perinuclear de los ovocitos de *X. laevis*

La isoforma del canal GIRK5 con el amino terminal más largo se denominó como el canal *Wild type* (GIRK5-WT). Cuando se estudió esta isoforma en los ovocitos de *X. laevis* se determinó que la expresión de canal no presentaba corrientes funcionales en la membrana plasmática, que tampoco se veía en la superficie celular cuando se expresaba como EGFP-GIRK5 y que se observaba de forma intracelular en un organelo que, morfológicamente, correspondía con la vesícula germinal y también un poco en la corteza del polo animal (Fig. 2.6) [Mora & Escobar; Díaz, 2007].

Para determinar la localización subcelular del canal GIRK5-WT se co-expresó junto con el marcador ECFP-ER (Fig. 6.5). Se observó que el canal y el marcador se encontraban con una distribución muy similar: en el espacio perinuclear, en el RE (probablemente sobre proteínas del citoesqueleto de queratina) y también en lamelas celulares. A diferencia del marcador de RE, el canal GIRK5 se observó en la vesícula germinal (n) y no se encontró tan distribuido en la membrana plasmática.

Una marcaje interesante se presenta alrededor de la vesícula germinal (n), lo cual podría corresponder con en la envoltura o membrana nuclear, donde también se observa que co-localizan el canal GIRK5 con el marcador de retículo. Esta forma de la membrana nuclear se había mostrado por D. Gard *et al* en 1997.

Con la construcción EGFP-GIRK5, se realizó un acercamiento a la vesícula germinal para observar mejor la localización del canal (Fig. 6.5 y Fig. 6.6). Se observa la fluorescencia dentro de la vesícula pero también como continua en el espacio perinuclear hacia el RE.

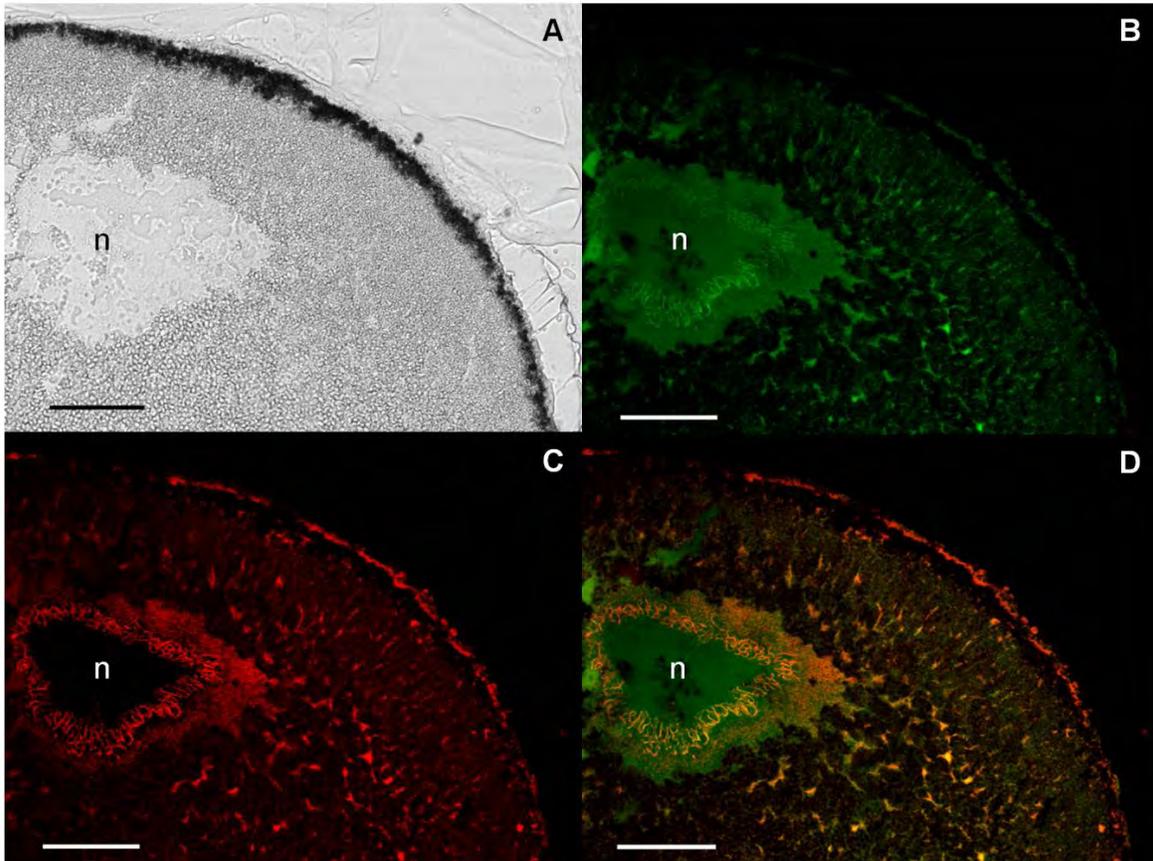


Figura 6.5 Localización intracelular del canal GIRK5 junto con el marcador ECFP-ER. Polo animal de un ovocito estadio VI de *X. laevis*. Microscopía de campo claro en A); microscopía confocal de B) EGFP-GIRK5 en verde, C) ECFP-ER en rojo, D) *Merge* en amarillo. Núcleo (n). Objetivo 40X, escala: 100 μ m.

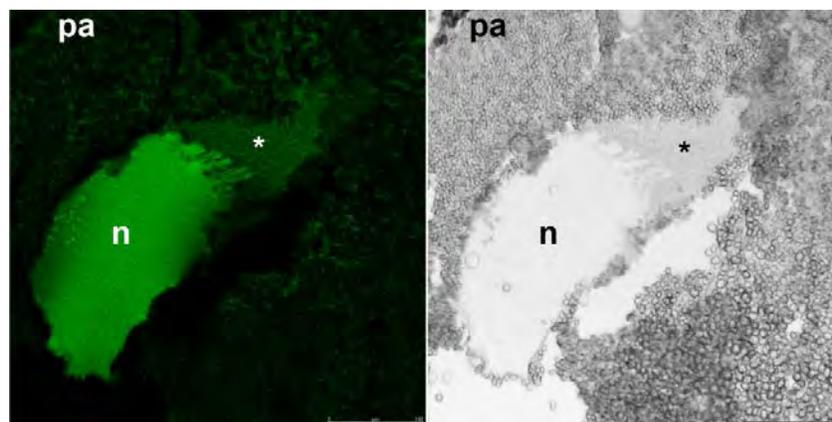


Figura 6.6 Localización del canal GIRK5 en la vesícula germinal del ovocito de *X. laevis* estadio VI. Izq. Micrografía de microscopía confocal y der. campo claro. (Pa) corresponde al polo animal y (n) al núcleo y (*) al espacio perinuclear y comienzo del RE. Objetivo 10X. Escala: 100 μ m.

El marcaje del núcleo no siempre se observó de forma total, algunas veces se encontró en forma reticular, dejando a la vista espacios sin fluorescencia (Fig. 6.7).

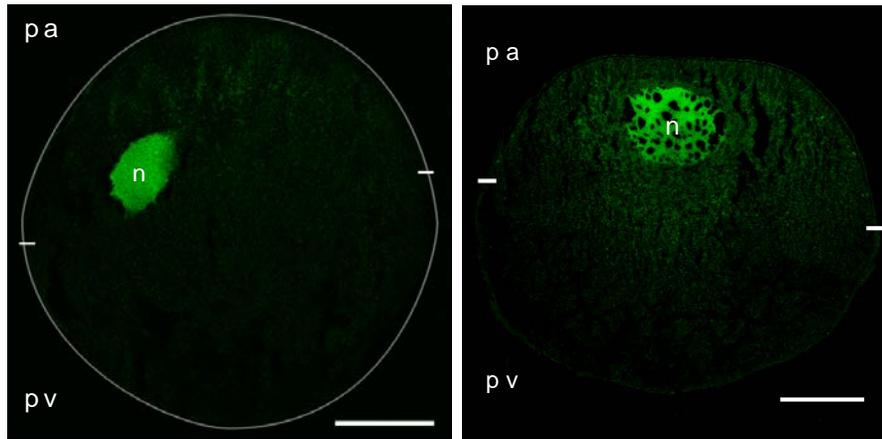


Figura 6.7 Vesícula germinal del ovocito estadio VI con los diferentes tipos de morfología observados. Localización de EGFP-GIRK5 en el núcleo (n). Objetivo 10X. n=13, escala: 250 μ m.

Por lo tanto, se decidió estudiar la presencia de EGFP-GIRK5 en núcleos aislados y completos por microscopía confocal (Fig. 6.8). Los resultados muestran que hay un poco de fluorescencia en el resto de las estructuras que permanecen sobre la membrana nuclear (que pueden ser yema que aún contenga membranas de RE o del espacio perinuclear). Sorprendentemente, los resultados para la localización dentro del núcleo muestran, que ni el interior nuclear, ni la membrana como tal, muestran fluorescencia.

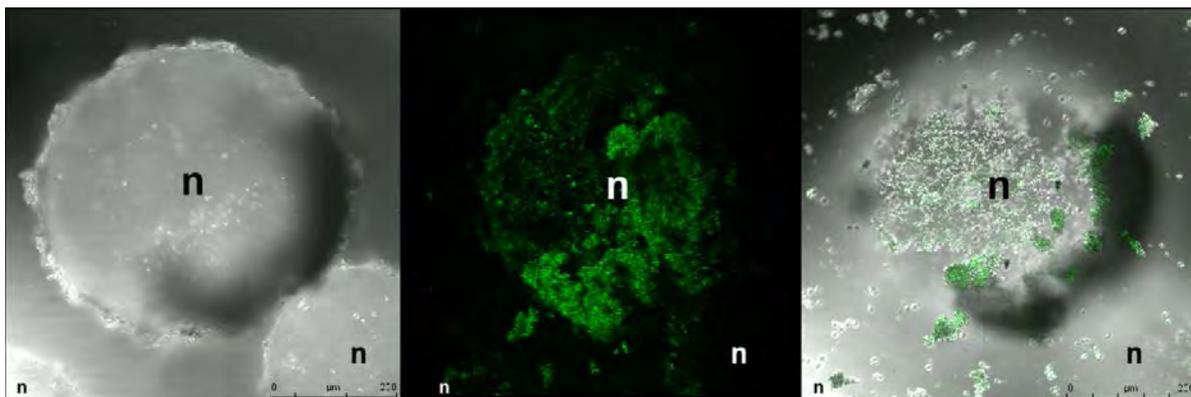


Figura 6.8 Ausencia del canal EGFP-GIRK5 en el núcleo de ovocitos de *X. laevis* estadio VI. A) Microscopía Nomarski y B) microscopía confocal de la región superior del núcleo. C) Traslape de ambos canales desde la región más distal a la proximal del núcleo. Objetivo 10X. Escala: 250 μ m.

La ausencia de señal dentro del núcleo o sobre su superficie podría deberse a una disminución de la fluorescencia por exponer los núcleos fuera del ovocito, y que al observarse *in vivo*, la fluorescencia haya decaído a niveles poco perceptibles. Ésta sería la versión menos probable, por otra parte, estos resultados sugieren que el canal GIRK5 no se localiza dentro del núcleo, más bien, debe de estar asociado con la red del citoesqueleto que esté más interconectada con la vesícula germinal, mas no forma parte del nucleoplasma o la envoltura nuclear; tal como sugiere D. Gard *et al* en cuanto a la interacción del citoesqueleto de queratina con la envoltura de la vesícula germinal, lo cual permite que junto con los microtúbulos se pueda ubicar el núcleo dentro del citoplasma [Gard *et al*, 1997].

6.3. Identificación de un motivo dibásico que participa en la retención del canal en el RE

La localización del canal GIRK5 en el RE no es la primera descripción para un canal iónico dentro de este organelo. Para los canales de potasio Kir se ha descrito que un motivo RKR, en el carboxilo terminal, origina la localización en el RE, de las subunidades Kir6.1/2 y SUR1, del canal K⁺(ATP) [Zerangue *et al*, 1999]. También, de forma más compleja, la localización del canal de potasio TASK-1, en el RE de células epiteliales depende de la interacción con la proteína adaptadora p11. Esta adaptadora tiene, en los 36 aminoácidos de su región carboxilo terminal, un motivo probable de retención en el RE del tipo (H/KxKxxx); el mutar dicha secuencia ocasiona la pérdida de la retención tanto del p11, como de la proteína TASK-1 [Renigunta *et al*, 2001].

Las secuencias KKXX, son secuencias típicas que permiten el retorno al RE y se encuentran en el extremo carboxilo terminal de las proteínas transmembranales del tipo II (con la región COO⁻terminal en el citoplasma) [Pelham, 1996]. Por el contrario las secuencias RRXX se han descrito con la misma función pero en proteínas transmembranales del tipo I (con la región NH₂-terminal en el citoplasma) [Schutze *et al*, 1994]. La secuencia KDEL suele presentarse en el carboxilo terminal de las proteínas luminales del RE. Las tres secuencias son reconocidas por las proteínas adaptadoras COP I durante el transporte retrógrado en la vía secretora [Pelham, 1996; van Vliet, 2003; Alberts, 2004].

El canal GIRK5 es un canal que posee tanto su extremo amino como carboxilo en el interior celular. Su retención intracelular depende de la fosforilación del residuo de tirosina, presente en la posición 16 del amino terminal. La ausencia de la fosforilación (por inhibidores de cinasas de tirosinas) o por la mutación del residuo de tirosina, permiten que el canal se dirija hacia la membrana plasmática donde presenta corrientes funcionales [Mora & Escobar, 2005].

En la secuencia del amino terminal se encuentran dos residuos básicos (KR) río arriba del residuo de tirosina (Y). Dados los motivos descritos anteriormente formados por dos residuos de carga positiva, es probable que, además del residuo de Y16, éstos también participen en localización del canal en el RE. Se estudió la localización de las siguientes mutantes de los residuos K13 y R14, en los ovocitos estadio VI:

Nombre	Extremo amino terminal		Descripción
	1	25	
GIRK5	MIPERMAPSPQWKRLYESPQL	IQTIMAR...	GIRK5-WT
K/A	-----A-----	-----	GIRK5-K13A
R/A	-----A-----	-----	GIRK5-R14A
KR/AA	-----AA-----	-----	GIRK5-K13A/R14A

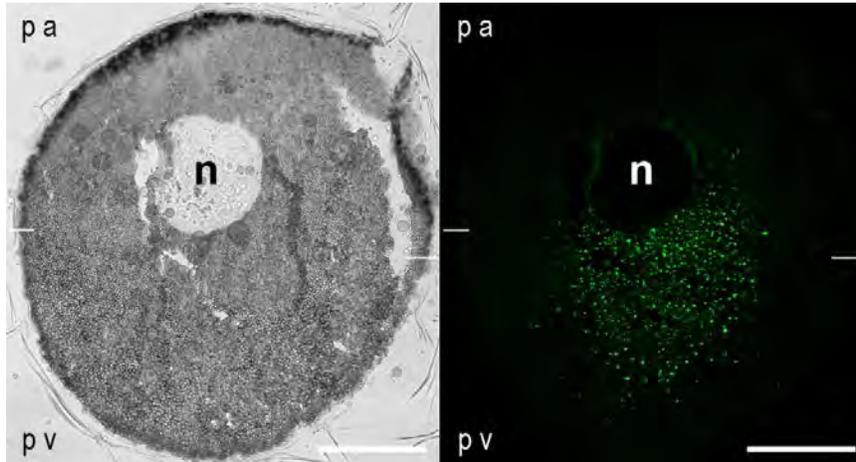


Figura 6.9 Localización intracelular del canal EGFP-GIRK5-K13A en ovocitos estadio VI. Micrografías de campo claro (izq.) y microscopía confocal (der.). El polo animal (pa) hacia arriba, el polo vegetal (pv) hacia abajo y el núcleo(n) en el polo animal. Las líneas blancas de los costados indican el límite entre los polos. Objetivo 10X, n=3, escala: 250 μ m.

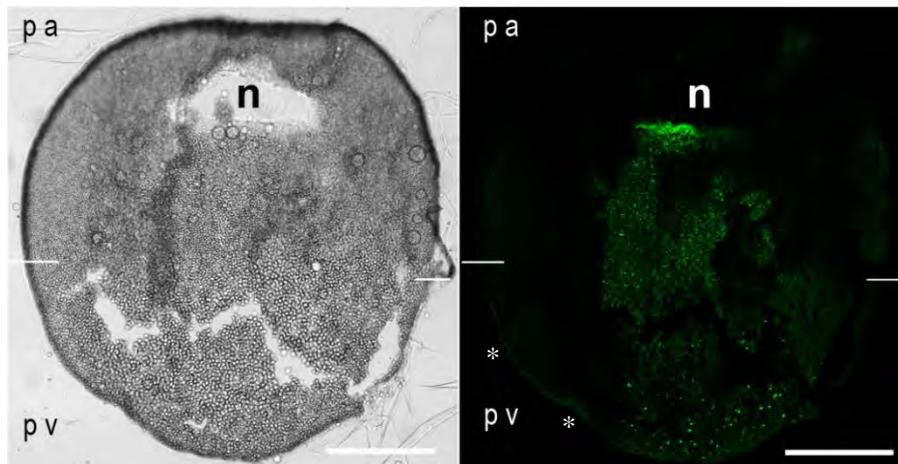


Figura 6.10 Localización intracelular del canal EGFP-GIRK5-R14A en ovocitos estadio VI. Micrografías de campo claro (izq.) y microscopía confocal (der.). El polo animal (pa) hacia arriba, el polo vegetal (pv) hacia abajo y el núcleo(n) en el polo animal. Las líneas blancas de los costados indican el límite entre los polos. (*) Fluorescencia en la membrana. Objetivo 10X, n=3, escala: 250 μ m.

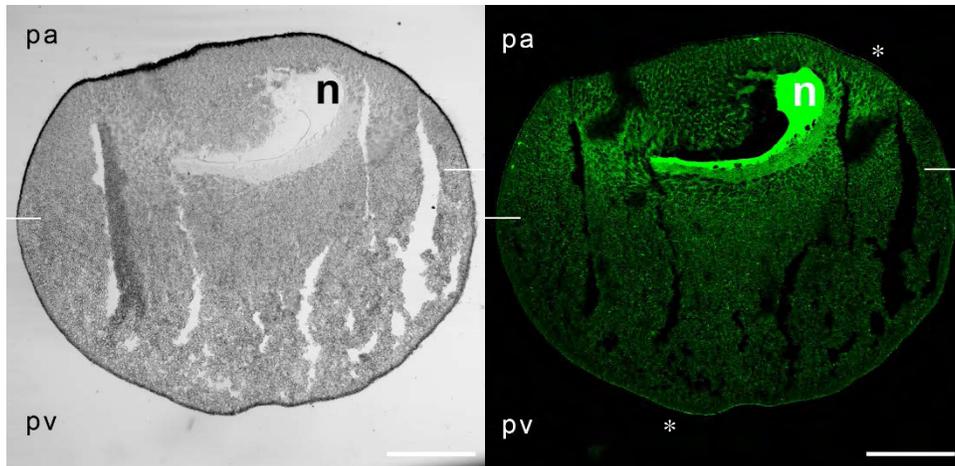


Figura 6.11 Localización intracelular del canal EGFP-GIRK5-K13A/R14A en ovocitos estadio VI. Micrografías de campo claro (izq.) y microscopía confocal (der.). El polo animal (pa) hacia arriba, el polo vegetal (pv) hacia abajo y el núcleo(n) en el polo animal. Las líneas blancas de los costados indican el límite entre los polos. (*) Fluorescencia en la membrana. Objetivo 10X, n=10, escala: 250 μ m.

Tanto la mutación del residuo de lisina (K), como el de arginina (R), fueron suficientes para permitir que el canal GIRK5 perdiera su retención y saliera del RE. La mutación GIRK5-K/A se observa alrededor del núcleo y distribuido en el citoplasma del polo vegetal, sin embargo no se observa la presencia del canal en la membrana plasmática de ninguno de los polos (Fig. 6.9).

La mutación GIRK5-R/A se observa en el espacio perinuclear, en el lado inferior del núcleo, también en el citoplasma vegetal y con más detenimiento se aprecian acumulaciones en la corteza vegetal, y la membrana plasmática muestra un poco de señal de fluorescencia (señalado por * en la Fig. 6.10, der.).

Aunque las dos mutaciones se exportaron del RE, su expresión en la membrana plasmática no fue la misma cuando se estudiaron mediante registros electrofisiológicos - *Voltage clamp* de dos electrodos-, realizados por M. en C. Claudia Rangel. En esos registros se observa que la mutante K/A no produce canales funcionales. En cambio, la mutación R/A sí presenta corrientes rectificadoras entrantes en la membrana plasmática [presentado en Rangel-García *et al*, 2014].

De forma sorprendente, el canal con la mutación de ambos residuos, GIRK5-KR/AA, se sigue observando en el RE y el espacio perinuclear, pero también incrementa la fluorescencia

en el citoplasma como ocurre con la isoforma $\Delta 25$ GIRK5 (Fig. 2.6 y 6.11). Además, al igual que GIRK5-R/A, con una observación minuciosa se aprecia señal de fluorescencia en la membrana plasmática, pero en este caso en ambos polos del ovocito (señalada con * en la Fig. 6.11). El registro de esta mutante por *Voltage clamp* muestra que este canal también es funcional y, comparado con la mutante GIRK5-Y/A, el canal GIRK5-KR/AA presenta un nivel de corriente tres veces mayor y en la mitad de tiempo (registros realizados por M. en C. Claudia Rangel) [presentado en Díaz-Bello *et al*, 2010].

En la localización de los otros miembros de la subfamilia de los canales GIRK no es raro observar que algunos se localicen intracelularmente. Mientras que los homotetrámeros de GIRK2 o GIRK4 sí pueden llegar a la membrana celular, los canales GIRK1 o GIRK3 se encuentran en el RE. Es necesario que los canales GIRK1 se asocien con otras subunidades diferentes para que se expresen en la membrana plasmática [Ma *et al*, 2002a].

En general, la localización de los canales GIRK depende de la expresión de motivos de retención, motivos de exportación del RE en la región amino terminal (DQDVESPV para GIRK2 y NQDMEIGV para GIRK4), o motivos de salida de post-Golgi para llegar a la membrana plasmática, éstos últimos basados en residuos ácidos o de carga negativa en la región carboxilo terminal (*acidic cluster*): ELETEEEE para GIRK2, EAEKEAEAEHDEEEEPNG para GIRK4. La mutación de estos residuos o el enmascaramiento de los motivos cuando los monómeros se asocian, origina que el canal cambié su localización característica [Ma *et al*, 2002b]. Los canales GIRK1 y GIRK3 carecen de motivos de exportación y por lo tanto necesitan asociarse con subunidades de GIRK2 o GIRK4 para que sus señales les permitan salir del RE [Ma *et al*, 2002b]. Estos ensayos se realizaron en células COS-7, pero también en ovocitos de *Xenopus laevis* para comprobar si había o no expresión funcional en la membrana plasmática, lo cual apoya la idea de que el ovocito comparte las vías de tráfico de proteínas y el reconocimiento de estas señales.

Aunque el canal GIRK5 comparte localización con GIRK1 y GIRK3, en vez de un motivo RXRR, los motivos que lo dirigen podrían estar más relacionados con aquellos descritos en los canales de potasio TASK1 y TASK3. Estos canales presentan en su extremo carboxilo un motivo tribásico, KRR, que es reconocido por proteínas COPI, y por proteínas adaptadoras 14-3-3; y en su extremo amino tienen un motivo dibásico, KR, reconocido por proteínas COPI [Zuzarte *et al*, 2009]. Tal como sucede con GIRK5, la mutación de la secuencia KR

origina un gran aumento en el nivel de corriente registrado, 4.5 veces mayor en el caso de TASK 1 y un poco menos para TASK3.

Las proteínas COPI se localizan en el organelo intermedio entre RE y Golgi (ERGIC) y además de los motivos descritos anteriormente, también interaccionan con sus variaciones presentes en el extremo carboxilo terminal de las proteínas: RXR, KRR, RXRR, XRRX o KXKXX (los motivos RKR y RXRR pueden estar también en otro dominio citoplásmico [Zerangue *et al*, 1999; Nufer & Hauri, 2003; Michelsen *et al*, 2005]). Este reconocimiento permite que proteínas residentes del RE, proteínas mal plegadas o de sólo un monómero se reconozcan y retornen al RE.

Las proteínas 14-3-3 también se encuentran en el ERGIC y son proteínas adaptadoras que reconocen principalmente motivos con serinas fosforiladas y residuos básicos: RSXS^(P)XP, RXXS^(P)XP o RXY/FXS^PXP; se unen con las proteínas cargo para interferir el reconocimiento por COPI y así provocar la exportación desde el RE. La fosforilación de un residuo de serina en estos motivos ^(P) es muy relevante para que puedan ser reconocidos [Nufer & Hauri, 2003].

Sin embargo, las proteínas 14-3-3 reconocen además otras señales que no poseen serinas. La subunidad Kir6.2 del canal de potasio rectificador entrante K_{ATP}, tiene una secuencia RKR reconocida tanto por las proteínas 14-3-3 como por COPI, de forma excluyente [Zerangue *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2003]. Hay que recordar que los canales están formados por varias subunidades, no son monoméricos y para el canal K_{ATP} la salida del RE sólo ocurre cuando se encuentra como octámero [Zerangue *et al*, 1999]. Yuan H *et al*, 2003, proponen que para llegar a la superficie celular, el reconocimiento de la proteína 14-3-3 sólo ocurre cuando el canal tiene cuatro o dos subunidades como mínimo, de lo contrario el monómero sería reconocido por COPI y regresado al RE.

Otro canal regulado por dos motivos es el canal de potasio KCNK3. Tiene un motivo de retención regulado por fosforilación: RRSS^PV y, al igual que los canales TASK1 o TASK3, también tiene en su amino terminal la secuencia dibásica KR. En 2002, O'Kelly *et al*, describieron que al igual que con RKR, el motivo dibásico KR puede interaccionar con las subunidades de COPI y con las proteínas 14-3-3 de forma mutuamente excluyente.

En cuanto al canal GIRK5, los resultados sugieren que los residuos de aminoácidos K13 y R14 podrían formar parte de estos motivos de tráfico y participar en la localización del canal en el RE. Al mismo tiempo, complementan la información que se tenía sobre la participación del residuo Y16; la fosforilación de este aminoácido origina que el canal llegue a la membrana plasmática. Sin embargo, la contribución de cada residuo no está clara del todo.

La mutante GIRK5-K13A deja presentes los residuos A¹³**RXY^(P)** y los resultados muestran que el canal sale del RE, pero no llega a la membrana plasmática, además se observan acumulaciones de fluorescencia en el citoplasma, entre el RE y la corteza. Esta acumulación podría sugerir que el motivo **RXY^(P)** aún es reconocido por proteínas adaptadoras que impiden su salida de post-Golgi y tratan de regresarlo. Un motivo similar, formado por **KXD/E**, es reconocido por COPI y permite la localización en Golgi [Gao *et al*, 2014].

La mutante GIRK5-R14A deja presentes los residuos **K¹³AXY^(P)** y los resultados muestran que el canal llega a la membrana plasmática. Esto puede sugerir que el motivo **KXXY^(P)** ya no es reconocido por adaptadoras de retorno, que en cambio puede ser reconocido por adaptadoras de exportación, o que permite el reconocimiento de otro motivo de exportación cercano.

GIRK5	<u>K</u>¹³<u>R</u>LY^(P)<u>E</u>SPQLI
* Reconocimiento por COPI	KR
* Reconocimiento atípico por 14-3-3	KR
* Motivo para unión a proteínas 14-3-3	RXY/FXS^PXP RXXXS^PXP
* Fosforilación de serinas	K/RXXXS KRXXS

Si observamos río arriba de la tirosina 16 puede observarse una serina que se encuentra en una secuencia consenso de fosforilación por PKG o PKA (**K/RXXXS** o **KRXXS**, respectivamente) [Pearson & Kemp, 1991]. De forma interesante se puede observar, que los residuos de carga básica son relevantes tanto para el reconocimiento por COPI, por proteínas 14-3-3 y para la fosforilación de serinas. La similitud entre los motivos de reconocimiento por proteínas 14-3-3 y las secuencias consenso de fosforilación de serinas, sugiere que estos sistemas

de señalización co-evolucionaron [Yaffe *et al*, 1997]. En ambos casos una arginina en posición -3 o -4 es relevante para la fosforilación o la interacción con las proteínas 14-3-3.

Si el motivo en el canal GIRK5 se reconociera por proteínas 14-3-3, esto implicaría que el residuo de serina 18 tendría que estar fosforilado; sin embargo, aún no ha sido demostrado. Además de PKA y PKG, tanto Cdc2/Ciclina B como MAPK son conocidas por fosforilar residuos de serina en una gran cantidad de proteínas durante la meiosis o mitosis y con ello participan en la regulación de la progresión del ciclo celular. El motivo de fosforilación que reconocen está formado por residuos de Serina-Prolina (S/TP) y en algunos casos la fosforilación se ve favorecida cuando existe un residuo aromático en la posición -1, -2 o -3 (como en la secuencia de GIRK5). La fosforilación por estas cinasas se lleva a cabo durante la fase M del ciclo celular, así que podrían fosforilar al canal GIRK5 pero sólo una vez que el ovocito haya salido de su arresto en G2 [Wu *et al*, 2010].

El canal GIRK5 posee además una tirosina fosforilable en la posición 16, la Y^(P) se encuentra río arriba de la serina y favorece la retención del canal (o su no-exportación del RE). Se ha reportado un caso similar en la proteína cbl (Casitas b-lineage lymphoma), que posee tirosinas y serinas fosforilables, pero cuya fosforilación es excluyente para la interacción con las proteínas 14-3-3 [Liu *et al*, 1999]; la fosforilación de tirosinas de la proteína cbl disminuye la interacción con las proteínas 14-3-3. Si el canal GIRK5 interaccionara con las proteínas 14-3-3, sería interesante ver cómo influye en la interacción la fosforilación de la tirosina y la serina; si fueran mutuamente excluyentes, tal vez la defosforilación de la tirosina permitiría el reconocimiento del canal por las proteínas 14-3-3 y esto evitaría el reconocimiento por las proteínas COPI, para así permitir su salida del RE.

A pesar de que la secuencia de reconocimiento de las proteínas 14-3-3 en el canal GIRK5 es muy parecida a lo reportado, no se observa un residuo extra entre serina 18 y prolina 19 que parece ser fundamental. Sin embargo dada la gran similitud de sus secuencias no podemos descartarlo, aunque sería necesario evaluar primero si existe la interacción de estas proteínas y entonces ver si repercutiría en el tráfico del canal.

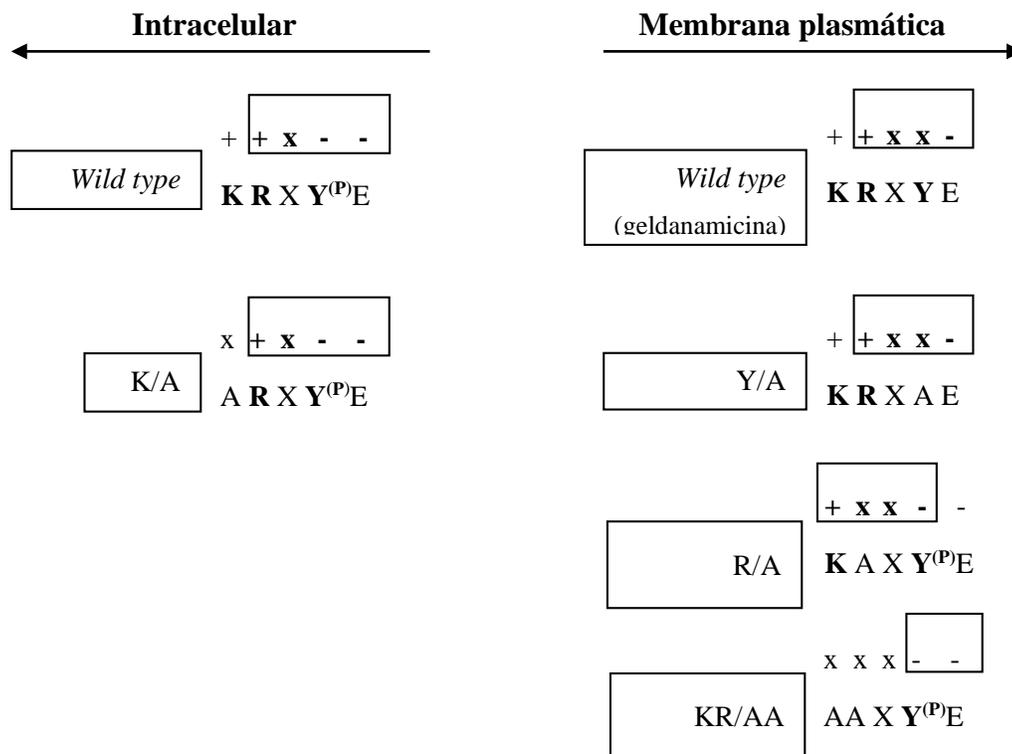
Por otra parte, la mutante GIRK5-K13A/R14A deja presente el residuo de tirosina fosforilable A¹³AXY^(P) y los resultados muestran que el canal si llega a la membrana plasmática y con mayor expresión. Esto evidencia que la ausencia de ambos residuos (K13 y

R14) es muy relevante para aumentar su expresión en la membrana plasmática; sin embargo, basta con el cambio de K13 para que se libere del RE y la ausencia de R14 para que llegue a la membrana plasmática (Fig. 6.9 y 6.10).

La secuencia consenso de fosforilación de tirosinas propuesta para el canal GIRK5-WT fue (I/L-Y-D/E-X-L) [Schmitz *et al*, 1996; Mora & Escobar, 2005]. Dado que las mutaciones de KR no la afectarían se considera que las proteínas mutantes continuarían fosforiladas. Sin embargo, sería necesario determinarlo experimentalmente para poder asegurarlo.

Las proteínas COPI presentan un *cluster* de residuos con carga negativa que reconocen las señales de carga positiva de las proteínas cargo. Con un análisis muy aventurado sobre las cargas de los motivos relacionados con el tráfico del RE, se observan dos cosas: los residuos positivos (ej. RKR, KRR) están principalmente en las señales de retención, mientras que los residuos negativos están en las señales de exportación (ej. para GIRK2: ELETETEEE o para canales Kir: EXE/D [Ma *et al*, 2001]).

Si se considera entonces que la tirosina está fosforilada, se podría observar lo siguiente:



A manera de resumen, si se observan las mutantes estudiadas, sus cargas y sus localizaciones se puede ver que las proteínas que no llegan a la membrana comparten el patrón $\boxed{+ X - -}$, por el contrario en las que sí llegan se observa como $\boxed{+ X X -}$. Llama la atención que mientras la carga + y la - estén separadas por sólo un residuo se favorece la localización intracelular y cuando están separadas por dos, se promueve la salida hacia la membrana plasmática. Sería necesario analizar varias proteínas para ver si este patrón se presenta en otros motivos. Por ejemplo, el motivo KXD/E (+ X -) permite la salida del RE, pero sin llegar a la membrana plasmática (localización en Golgi) y es reconocido por COPI [Gao *et al*, 2014].

Para permanecer en el retículo parece importante (+ + X -), para salir sin llegar a la membrana (+ X - -) y para llegar a la membrana (+ X X -). La mutante con mayor expresión en la membrana plasmática fue (X X - -).

Sin duda, para este canal la fosforilación de la tirosina forma parte del motivo de retención y/o su defosforilación forma parte de otro motivo de exportación. Por lo tanto, la hipótesis más probable sería que el motivo **KRXY^(P)** es reconocido por adaptadoras de retorno a RE, como COPI, que con la falta del residuo de lisina (K) se queda en Golgi o endosomas. Serían necesarios otro tipo de experimentos para determinar si el reconocimiento de esta secuencia efectivamente ocurre por COPI u otras proteínas y si las mutaciones GIRK5-K/A y GIRK5R/A mantienen el residuo de tirosina fosforilado.

La secuencia KRXY^(P) podría formar a la vez parte de un motivo de retención y exportación del RE, tendría que ser reconocida por uno u otro adaptador dependiendo lo que se requiera. Y nos gustaría pensar que este reconocimiento regula de forma excluyente la retención o exportación; pues no es raro que un motivo de retención y uno de exportación se localicen muy juntos. Incluso, la yuxtaposición de dos motivos de localización diferentes incrementa la posibilidad de que al traslapar regiones de aminoácidos, éstas jueguen un papel importante como dominios adaptadores en el ensamblaje secuencial y acoplado de las cubiertas vesiculares, durante el transporte de las proteínas cargo, a través de las vías de endo y exocitosis [Nishimura & Balch, 1997].

Resulta interesante el hecho de que sea la fosforilación de la Y16 quien pueda determinar su localización; dado que, si la función del canal GIRK5 estuviera relacionada con la maduración del ovocito, ésta sería una forma rápida de regular el tráfico del canal en caso de que se requiera su presencia en la superficie o no.

6.4. Identificación de un motivo de dileucina que participa en la localización polarizada del GIRK5-Y16A

La mutación del canal GIRK5-Y16A origina un canal funcional, que llega a la membrana plasmática y que al observarse intracelularmente muestra una localización preferente en el polo vegetal (Fig. 2.6). Esta localización se determinó después de cuatro días de expresión del ARNm, donde se observa el canal ya polarizado. Si el canal llegaba a todo el ovocito y después se concentraba en el polo vegetal o si su localización era directa, no se había determinado. Para determinar cómo ocurrió esa localización se realizó un curso temporal de cuatro días, analizando la expresión cada 24 horas (Fig. 6.12).

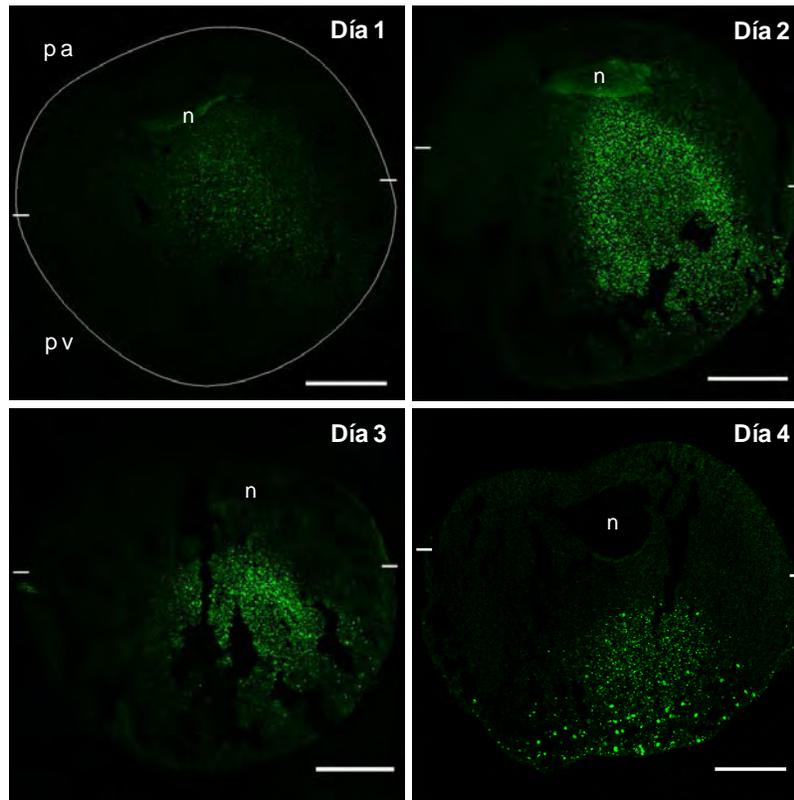


Figura 6.12 Curso temporal de la expresión de GIRK5-Y16A. El tiempo de expresión del ARNm fue de 1, 2, 3 y 4 días. El polo animal (pa) arriba con el núcleo (n) y el polo vegetal (pv) abajo. Objetivo 10X. Escala 250 μ m. La circunferencia del ovocito del día 1 se indica con un círculo blanco y la separación entre polos, con pequeñas líneas blancas.

Durante el día 1 (Fig. 6.12) el nivel de traducción del canal aún es muy bajo, sin embargo se observa un poco de fluorescencia en el núcleo y en el citoplasma subyacente. En el día 2 se observa mayor presencia en el citoplasma desde el núcleo hacia la corteza vegetal. En el día 3 la fluorescencia se aprecia sólo en el citoplasma y corteza vegetal. En el cuarto día, se observa la expresión en el polo vegetal, en acumulaciones dentro del citoplasma y hasta la membrana plasmática, los resultados del día 5 y 6 fueron los mismos que para el día 4 (no se muestran). Con estos resultados puede verse como la localización polarizada ocurre desde el RE hacia el polo vegetal, sin expresarse o pasar por el polo animal a niveles perceptibles con esta técnica.

Por otra parte, para analizar la localización de los canales GIRK5, GIRK5- Δ 25 y GIRK5-Y16A se determinó de forma cuantitativa la fluorescencia observada en las micrografías, se utilizó el *software* Leica LAS AF Lite, para calcular la intensidad de fluorescencia relativa en cada polo con respecto al ovocito (Fig. 6.13, B).

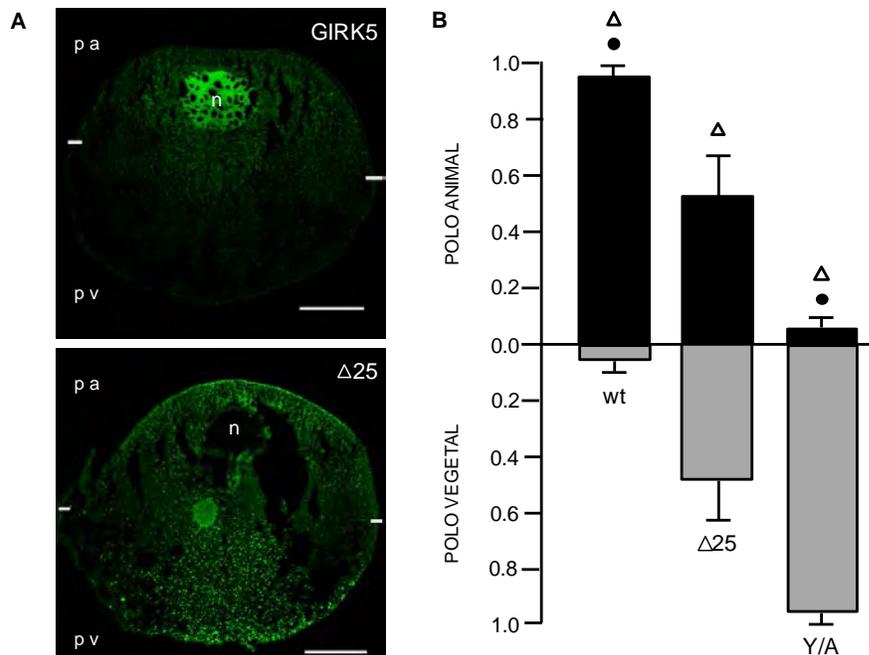


Figura 6.13 Localización intracelular de GIRK5-WT, Δ 25GIRK5 y GIRK5-Y16A. **A)** Imágenes de microscopía confocal, polo animal (pa) en la parte superior, polo vegetal (pv) en el inferior. La separación entre polos se señala en la membrana con pequeñas líneas blancas y al centro el núcleo (n). Objetivo 10X, escala: 250 μ m. **B)** Cuantificación de fluorescencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar; n=4-6. ● El círculo indica diferencias significativas del polo animal comparado con el polo vegetal de mismo ovocito (prueba t-Student pareada, P < 0.001). ▲ El triángulo indica diferencias significativas entre los canales (ANOVA de una vía. P < 0.005).

Del análisis de fluorescencias (Fig. 6.13, B) se puede comprobar que el canal GIRK5-WT se encuentra en el polo animal, dada su localización en el espacio perinuclear, RE y corteza del polo animal (discutida en los capítulos anteriores). El canal que carece de los primeros 25 aminoácidos, GIRK5- Δ 25 se encuentra distribuido homogéneamente, su distribución se observa desde el citoplasma y hasta en la membrana plasmática de ambos polos, lo cual coincide con los registros electrofisiológicos reportados por Mora & Escobar en 2005. Para el canal GIRK5Y16A se determinó que su cantidad de fluorescencia fue significativamente mayor en el polo vegetal con respecto al polo animal y también muestra diferencias significativas al compararse con el canal GIRK5 y GIRK5- Δ 25. Este resultado es interesante porque implicaría la localización polarizada de un canal rectificador entrante, endógeno de los ovocitos de *Xenopus*.

De los motivos de polarización reportados para proteínas de epitelios y neuronas, se observa que el canal GIRK5 presenta la secuencia **ESPQLI**, que corresponde al motivo [D/E]XXXL[L/I]. Este motivo se ha relacionado con la localización en lisosomas, internalización de receptores desde la membrana plasmática al sistema endosomal y localización basolateral en epitelios o en las dendritas de las neuronas [Bonifacino & Traub, 2003].

Se decidió realizar la mutación de la secuencia para ver si estaba relacionado con la localización del canal GIRK5, se sabía que era necesario retirar la Y16 para permitir la salida del RE y observar la localización polarizada, y que el motivo se acompaña por un residuo ácido, así que se generaron las siguientes mutantes:

Nombre	1	13	16	25	Descripción	
GIRK5	MIPERMAPSPQW	KRL	Y	ESPQLI	QTIMAR...	GIRK5-WT
Y/A	-----	-----	A	-----	-----	GIRK5-Y16A
YLI/AAA	-----	-----	A	AA	-----	GIRK5-Y16A/L21A/I22A
YELI/AAAA	-----	-----	AA	AA	-----	GIRK5-Y16A/E17A/L21A/I22A

Se expresaron junto con la proteína fluorescente EGFP y se determinó su localización dentro de los ovocitos de *X. laevis* de estadio VI.

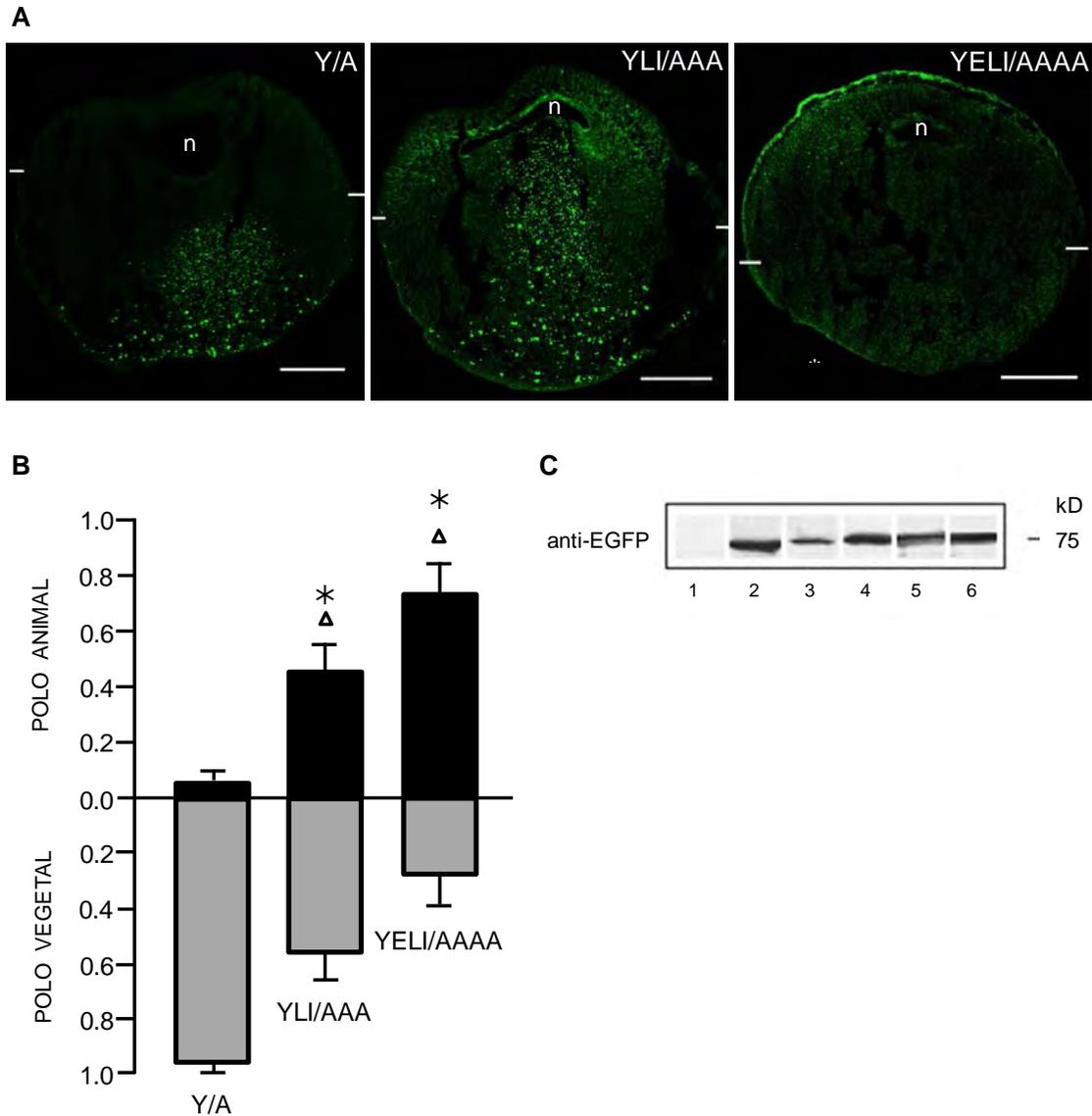


Figura 6.14 Efecto del motivo de dileucina en la localización del canal GIRK5.

A) Imágenes de microscopía confocal de las quimeras con EGFP, el polo animal en la parte superior contiene al núcleo (n) y el polo vegetal hacia el inferior. Objetivo 10X. Escala 250 μ m. **B)** Cuantificación de fluorescencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar, n=4-6. Δ El triángulo indica diferencias significativas comparadas con el canal GIRK5-Y16A (ANOVA de una vía, $P < 0.001$); el asterisco indica diferencias significativas entre esos canales (ANOVA de una vía, $P < 0.001$). **C)** Western-blot con un anticuerpo monoclonal para EGFP, 1. No inyectados, 2. GIRK5- Δ 25, 3. GIRK5-WT, 4. GIRK5-Y16A, 5. GIRK5-YLI/AAA y 6. GIRK5-YELI/AAAA. Peso de las construcciones: 75Kd.

En los resultados (Fig. 6.14, A) se observa que la localización polarizada cambia cuando se muta la secuencia LI (GIRK5-YLI/AAA); aunque continúa presente en el citoplasma vegetal se distribuye también en el polo animal, originando una localización igual en ambos polos como la descrita para GIRK5- Δ 25. De forma interesante, se observa que cuando se muta además el residuo ácido (GIRK5-YELI/AAA) la localización pasa al polo opuesto. Aunque se sigue observando un poco de fluorescencia en la zona de la membrana plasmática y corteza del polo vegetal (asterisco blanco), existen diferencias significativas con el canal GIRK5-YLI/AAA.

Si observamos la gráfica de la fluorescencia relativa para YLI/AAA y YELI/AAAA (Fig. 6.14, B), se encuentran resultados que, aunque parecidos, son significativamente diferentes. Esto puede deberse a que en algunos casos el canal GIRK5-YELI/AAAA mostraba a la par de la localización en el polo animal, pequeñas acumulaciones en el citoplasma vegetal, como las observadas para Y16A o YLI/AAA pero en menor cantidad y a que el canal YLI/AAA no muestra una intensidad en el polo animal tan grande como la observada para YELI/AAAA.

En el análisis por Western-blot (Fig. 6.14, C) se puede observar que en todos los casos se encontró que los ovocitos expresaban una proteína quimérica el tamaño de 75Kd, esperado para las construcciones de EGFP + GIRK5.

El motivo de dileucinas [D/E]XXXL[L/I] se ha relacionado con varias funciones, pero desde 1994, Matter *et al* reportaron que la presencia de uno a tres residuos ácidos río arriba de las leucinas, favorecía más la localización basolateral que la internalización. Y también se ha descrito para algunas proteínas con localización basolateral en epitelios, que su localización puede darse directamente desde Golgi a la membrana plasmática o desde Golgi hacia el lado apical o basolateral de la membrana y después cambiar por transcitosis. Este mecanismo de localización propone que las proteínas pueden tener al mismo tiempo motivos de localización apical y basolateral. Entonces, al salir del post-Golgi, todas las proteínas pueden partir hacia un polo, pero dependiendo de los motivos que presente (algunos pueden tener más peso que otros) hay un segundo reconocimiento que origina que la proteína cambie de polo por transcitosis o permanezca en la primera ubicación.

Con estos resultados podemos proponer que el motivo EXXXLI del canal de potasio actúa como una secuencia de polarización hacia el lado vegetal del ovocito. Esta determinación es la primera que se realiza con respecto a un motivo de localización polarizada, reconocido en este modelo celular y además para una proteína endógena de los ovocitos de *X. laevis*.

Durante un análisis por registros electrofisiológicos de la secuencia ESPQLI, se mutaron individualmente los residuos de aminoácidos para ver su participación en la expresión funcional [tesis de maestría, M. en C. Claudia Rangel]. Sorprendentemente los resultados mostraron que las mutaciones del residuo I22 generaban canales funcionales en la membrana plasmática, aunque estuviera presente la tirosina 16. Se realizaron las mutaciones de la secuencia de dileucina preservando la tirosina 16 [M. en C. Claudia Rangel] y se expresaron en los ovocitos para observar su localización.

Nombre	1	13	16	22	25	Descripción
GIRK5	M	I	P	E	R	GIRK5-WT
I/A	-----	-----	-----	A	-----	GIRK5-Y16A
LI/AAA	-----	-----	-----	AA	-----	GIRK5-Y16A/L21A/I22A
ELI/AAAA	-----	-----	A	AA	-----	GIRK5-Y16A/E17A/L21A/I22A

Los resultados obtenidos por microscopía confocal y cuantificación de fluorescencia (Fig. 6.15, A y B) muestran que efectivamente la mutante GIRK5-I22A no se encuentra en el retículo endoplásmico como el canal GIRK5-WT y su localización continua siendo mayor en el polo vegetal, sin embargo al compararla con la mutante GIRK5-Y16A, se observa una polarización menor.

La mutación de los dos residuos de LI (GIRK5-LI/AA) origina que la polarización sea aún menor, persiste al compararse con la mutante GIRK5-Y16A, pero no se iguala a la distribución homogénea del canal GIRK5- Δ 25.

Cuando finalmente se muta todo el motivo EXXXLI, se observa que el canal GIRK5-ELI/AAA pierde su localización mayoritaria del polo vegetal y es estadísticamente diferente con GIRK5-Y16A e igual con GIRK5- Δ 25, lo que implica que se encuentra tanto en el polo vegetal como animal.

Estos resultados nos sugieren que el residuo de glutamato es muy relevante para mantener la localización polarizada del canal, algo que se observó tanto en las mutantes que estaban carentes del residuo de tirosina 16 (Fig. 6.14) o lo tenían presente (Fig. 6.15).

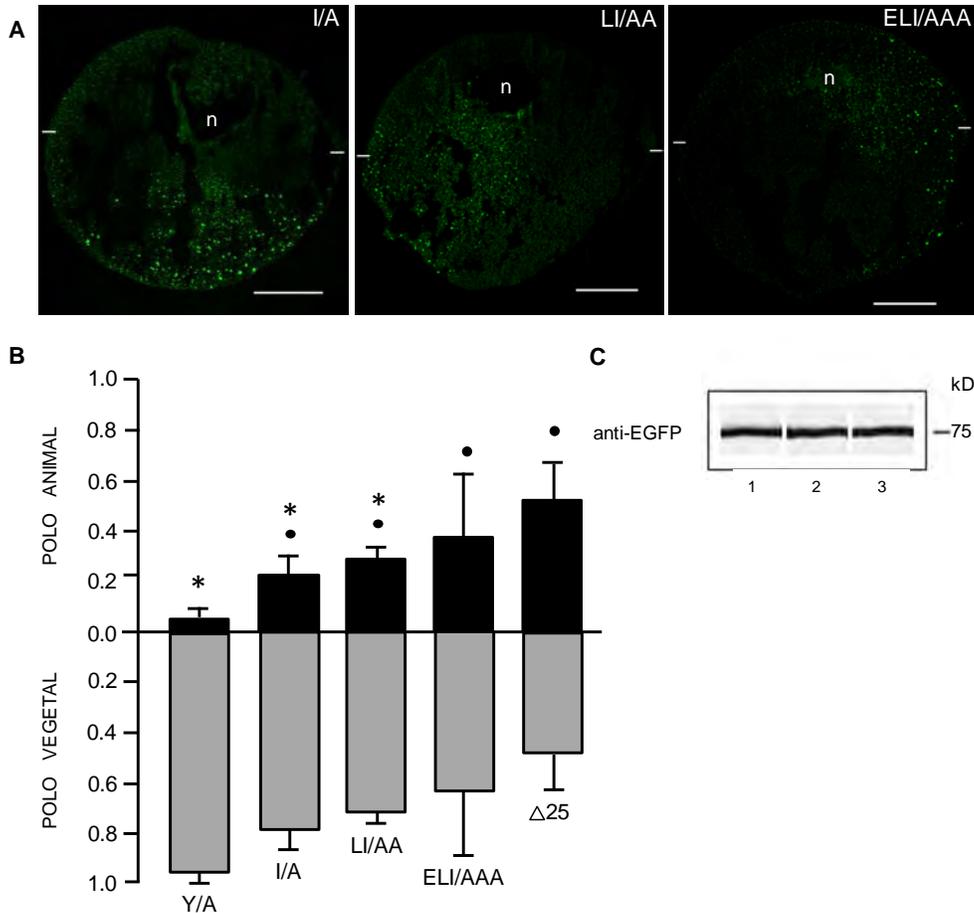


Figura 6.15 Efecto del residuo de glutamato en la polarización del canal GIRK5.

A) Imágenes de microscopía confocal de las quimeras con EGFP, el polo animal en la parte superior contiene al núcleo (n) y el polo vegetal hacia el inferior. Objetivo 10X. Escala 250 μm. **B)** Cuantificación de fluorescencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar, n=4-6. El círculo y el asterisco indican diferencias significativas al comparar los canales con la mutante Y/A y D2, respectivamente (ANOVA de una vía, $P < 0.05$). **C)** Western-blot con un anticuerpo monoclonal para EGFP, 1. GIRK5-I/A, 2. GIRK5-LI/AA, 3. GIRK5-ELI/AAA. Peso de las construcciones. 75Kd.

Además del efecto del residuo de glutamato, para el motivo de dileucina los aminoácidos intermedios se definen como irrelevantes (XXX), sin embargo, se ha observado que la presencia de una prolina en esa región puede tener efectos distintos en la localización. Se describió que tanto GLUT 8 como GLUT12 tienen un motivo de dileucina que origina su localización en lisosomas o membrana plasmática, respectivamente. En GLUT8 la prolina se encuentra al final antes de las leucinas como XXP, en GLUT12 se encuentra en medio XPX, tal como se observa para GIRK5: ESPQLI, donde permite también la localización en la

6.5 Localización polarizada del canal renal ROMK en ovocitos de *X. laevis*

A pesar de ser muy utilizado como sistema de expresión heteróloga de canales y transportadores, los ovocitos de *X. laevis* no son considerados como células polarizadas en los estudios del registro de corrientes iónicas. Sin embargo por los resultados obtenidos se decidió estudiar la localización de algún canal polarizado en epitelios y ver si éste se mantenía polarizado dentro de los ovocitos.

Se utilizó el canal rectificador ROMK, que se localiza en la membrana apical renal. Se utilizó fusionado a la proteína GFP y se expresó el ARNm durante 3 días.

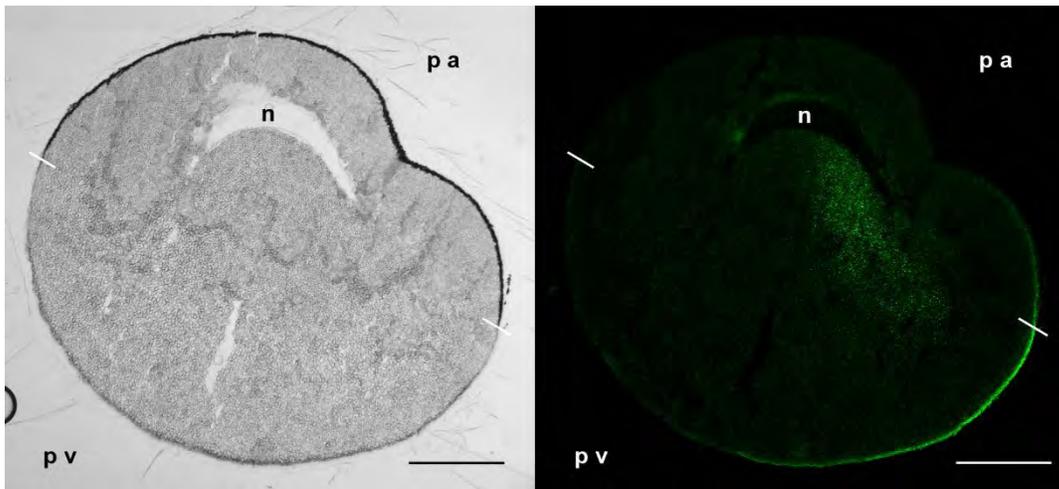


Figura 6.16 Localización polarizada del canal renal ROMK1 en ovocitos de *X. laevis*. Izq., imagen de campo claro, polo animal arriba y polo vegetal hacia abajo. Der. Microscopía confocal, se observa el canal en el polo vegetal. Objetivo 10X. Escala 250 μ m, n=3.

Los resultados muestran que el canal GFP-ROMK se localiza polarizadamente en los ovocitos de *X. laevis*, su localización es principalmente vegetal y sobre todo en la membrana plasmática (Fig. 6.16). Se observa que en algunos casos hay señal de fluorescencia en el citoplasma, desde el núcleo con dirección a la membrana plasmática, pero pueden ser los canales que se están transportando hacia la membrana plasmática.

Estos resultados son muy importantes para mostrar que una proteína polarizada en epitelios puede localizarse también polarizadamente en estos ovocitos. Sin embargo, aunque

la localización ocurre en uno solo de los polos, se esperaba que ésta fuera en el polo animal. Las señales de dileucina son motivos de localización basolateral y observamos el canal GIRK5 localizado en el polo vegetal. El canal ROMK se encuentra en la membrana animal y se observó también en el polo vegetal.

Sin duda alguna, el ovocito comparte motivos de reconocimiento y proteínas que originan el tráfico polarizado; sin embargo, falta determinar si las proteínas que originan el tráfico polarizado: las adaptadoras (que reconocen las proteínas cargo), las proteínas que acarrean las vesículas sobre el citoesqueleto o incluso la polaridad de los filamentos y túbulos del citoesqueleto, se encuentra de la misma manera que en las otras células polarizadas. La especificidad de las proteínas encargadas del tráfico permite originar tejidos específicos en cuanto al tráfico de proteínas, por ejemplo, la ausencia de clatrina en el túbulo proximal renal y la expresión la proteína adaptadora AP1B origina en estas células una polarización distinta al resto de los epitelios y gracias a eso el riñón puede llevar a cabo correctamente sus funciones fisiológicas [Schreiner *et al* 2010].

En las células polarizadas más estudiadas (epitelios y neuronas) se sabe que los dominios de polarización sí se comparten, las proteínas localizadas en la membrana basolateral de epitelios se van hacia las dendritas y las proteínas apicales hacia los axones [Alberts B *et al*, 2004]. Sin embargo una equivalencia hacia los polos del ovocito de *Xenopus* no parece simple.

La localización de la mutante GIRK5-Y16A (que tiene el motivo de dileucina) podría sugerir que el polo vegetal corresponde a la membrana basolateral de los epitelios; sin embargo, los resultados de la localización del canal ROMK1, también en el polo vegetal, podrían poner de manifiesto que la equivalencia no es tan sencilla. El canal ROMK1 se localiza típicamente en la membrana apical del epitelio renal, por lo tanto sería difícil concluir, con estos resultados, que las proteínas de epitelios o neuronas tendrán una localización polarizada hacia un polo en particular.

6.6. Localización del canal GIRK5 en ovocitos maduros (metafase II)

La localización polarizada de proteínas dentro de los ovocitos de *X. laevis* completamente desarrollados, pero inmaduros, no se ha estudiado con profundidad, a pesar de ser un modelo muy utilizado para estudiar la biología del desarrollo. La polarización de los determinantes necesarios para la formación correcta del embrión implica polarización de ARN mensajeros y proteínas [King *et al*, 2005], el caso más estudiado corresponde al de la proteína *disheveled* (*Xdsh* en *Xenopus*). *Xdsh* es necesaria para la señalización por Wnt en la formación del eje secundario de los embriones [Sokol *et al*, 1995; Miller *et al*, 1999]. Otro ejemplo son las proteínas X-Stau1/2, que participan en el anclaje de ARNm maternos a la corteza vegetal [Allison R *et al*, 2004] y uno más es Fatvg que participa en la rotación cortical y el establecimiento del eje dorsal-ventral [Chan *et al*, 2007].

Un caso interesante es el observado para la ATPasa Na/K endógena de ovocitos de *X. laevis* [Mohanty & Gupta, 2012]. Su localización en ovocitos inmaduros se observa en el polo apical, pero una vez que los ovocitos se preparan para ser fertilizados, maduran por acción de la progesterona y entran a la metafase II, la localización cambia y los canales se internalizan.

Con la Bióloga Lourdes Vázquez se realizaron algunos experimentos de maduración *in vitro* (con progesterona) de los ovocitos junto a la expresión de algunos canales GIRK5 (como GIRK5-WT y GIRK5-Y16A) (Fig. 6.17). Se observó que cuando los ovocitos expresan canales funcionales, (GIRK5-KR/AA o GIRK5-Y16A) los ovocitos maduran en mayor proporción con respecto a los ovocitos control. En algunos casos bastó la expresión de los canales funcionales para provocar la maduración; en otros, este efecto se vio potenciado con la presencia de progesterona [Tesis de Lic. Vázquez Lourdes, 2013]. En ambas situaciones fue evidente que un canal funcional favorece la maduración.

Estos resultados sugieren que el canal funcional GIRK5-Y16A participa de alguna forma en la maduración de los ovocitos. Sería interesante determinar si es por que participa en alguna vía de transducción de señales, por cambios en el potencial de membrana cuando el ovocito está pasando de metafase I a II o si su función como canal se preserva en los ovocitos maduros.

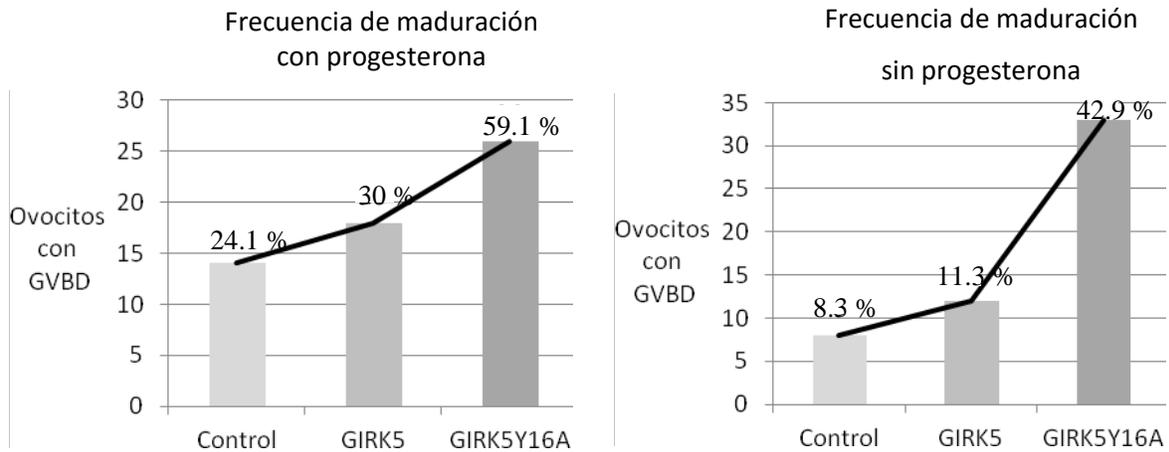


Figura 6.17 Efecto de los canales GIRK5-WT y GIRK5-Y16A en la maduración de los ovocitos de *X. laevis*. Frecuencia de maduración de los ovocitos inyectados con el canal GIRK5-WT que permanece en el RE y con la mutante GIRK5-Y16A que llega a la membrana plasmática y es funcional. Porcentaje de ovocitos inyectados e incubados durante 48 horas, con (izquierda) y sin progesterona (derecha).

El registro de corrientes iónicas de los canales GIRK5 se ha descrito como variable durante las épocas del año [Bauer *et al*, 1996], y la rana *X. laevis* tiene un periodo de receptividad sexual durante el verano (estro estacional). Sin embargo, se desconoce si el canal es funcional en esa época del año, si lo es (o no) en los ovocitos maduros o incluso si su localización es la misma.

Se decidió utilizar los canales GIRK5-WT (localizado en el RE), GIRK5-Y16A (localizado en el polo vegetal) y GIRK5-YELI/AAA (localizado en el polo animal) para estudiar si había cambios o no en su localización intracelular al expresarse en ovocitos maduros (metafase II, GVBD).

Estas determinaciones se realizaron en ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Los ovocitos madurados *in vivo* se obtuvieron de ranas *X. laevis* durante el verano; para la maduración *in vitro*, los ovocitos obtenidos en otra época del año se indujeron con progesterona. Se consideraron ovocitos maduros cuando éstos presentaban una mancha blanca en el polo animal (señal de la ruptura de la vesícula germinal, GVBD) (Img. 6.18). Y se segmentaron para comprobar la ausencia del núcleo. Los resultados fueron los mismos para maduración *in vivo* (obtenidos en verano) e *in vitro* (madurados con progesterona).

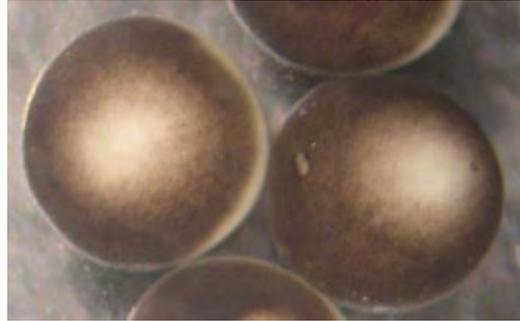


Imagen 6.18 Despigmantación del polo animal característica de la ruptura del núcleo (GVBD). Los ovocitos maduros muestran en el centro del polo animal una despigmantación que indica que los ovocitos pasaron a metafase II.

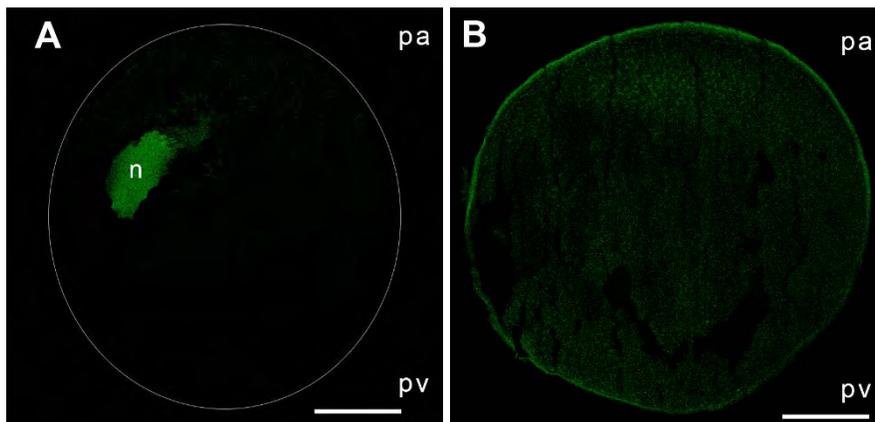


Figura 6.19 Cambios en la localización intracelular del canal EGFP-GIRK5-WT. A) Microscopía confocal de ovocitos estadio, (n) corresponde al núcleo VI. B) Microscopía confocal en ovocitos maduros. Polo animal hacia arriba (pa), polo vegetal abajo (pv). Los ovocitos maduros ya no presentan núcleo, n= 6. Objetivo 10 X. Escala: 250 μ m.

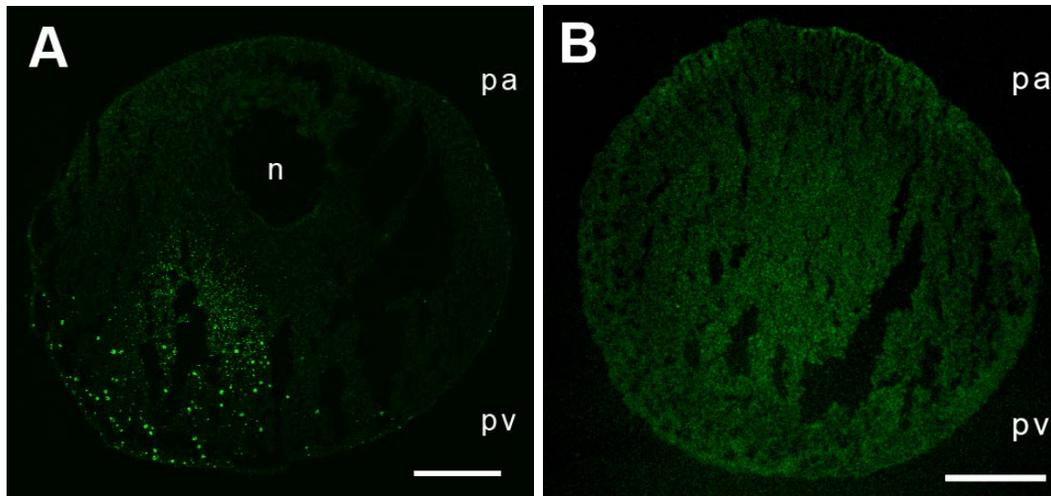


Figura 6.20 Cambios en la localización intracelular del canal EGFP-GIRK5-Y16A. A) Microscopía confocal en ovocitos estadio VI. B) Microscopía confocal en ovocitos maduros, n=5. Polo animal (pa) arriba, polo vegetal (pv) abajo. Objetivo 10 X. Escala: 250 μ m.

En estos resultados puede observarse que la localización de los canales GIRK5-WT en ovocitos maduros es totalmente distinta (Fig. 6.19), ocurre lo mismo para la mutante GIRK5-Y16A (Fig. 6.20), ambos se localizaron en la membrana plasmática cuando ya están en metafase II (Fig. 6.19 B y Fig. 6.20 B). En estos ovocitos, en cuanto a la morfología del núcleo, el cambio más aparente es la ruptura del núcleo (GVBD, Germinal Vesicle Break Down) y por lo tanto ya no se observa más.

La regulación de proteínas para la maduración es un proceso muy importante para los gametos. Durante el estadio VI de los ovocitos, las tasas de transcripción y traducción son muy diferentes a las de una célula somática, o incluso a las de un ovocito en un estadio previo. En el estadio VI, ya no existe síntesis nueva de DNA, se han transcrito los ARNm necesarios que tendrán una función durante el paso a meiosis II o durante la fertilización y se han traducido las proteínas que serán requeridas [Gilbert, 2005].

Por lo tanto, si el canal GIRK5 se encuentra presente desde el estadio VI de los ovocitos es muy probable que su función sea requerida en ese momento. Una manera aproximada de determinar la presencia de una proteína es mediante un análisis de EST (*expressed sequenced tags*)

Existen bibliotecas genómicas desarrolladas para algunos organismos en diferentes estadios del desarrollo, desde ovocitos en meiosis I, ovocitos fecundados, blástula, gástrula y hasta embriones. En estas bibliotecas se reporta con qué frecuencia se encontró la expresión de un gen de interés, en cierto número de clonas. De esta manera puede estimarse cómo se encuentra el nivel de los ARN mensajeros de una proteína en particular.

De acuerdo con una base de datos para *X. laevis* (<http://genomics.crick.ac.uk/cgi-bin/public.exe>), el análisis de EST muestra que el canal GIRK5 está presente en el estadio de una célula, es decir, cuando aún no ocurre ninguna división celular (Fig. 6.21). Se observa además que el resto de los estadios no presentan clonas con expresión para este canal.



Fig. 6.21 Niveles de expresión estimada para el canal GIRK5 en los primeros 60 estadios del embrión de *X. laevis*. En azul la escala que representa un nivel de expresión del 0.001%. En verde el nivel de expresión para GIRK5 con un 0.0043% en el estadio 1. El resto de los estadios no muestra clonas que expresen el ARNm para del canal.

De acuerdo con este análisis el canal GIRK5 se expresa en los ovocitos estadio VI pero no más allá del estadio 10. La limitación de este tamizaje está en que no se reportan secuencias para cigotos en estadios tempranos, por lo tanto, con esta aproximación no puede saberse si el canal se degrada una vez que se da la fertilización persiste durante las primeras divisiones celulares [Beck & Slack, 2001]. Sin embargo, el hecho de que se exprese en gran cantidad en el estadio 1, y que la localización del canal sea en la membrana plasmática, cuando los ovocitos están maduros, apoyan la idea de que la función del canal es muy relevante al inicio de la fecundación.

En otra opción más detallada de EST se muestra la expresión del ARNm con respecto a las horas que transcurren después de la fertilización (<http://genomics.crick.ac.uk/cgi-bin/profile-search.exe>). En este análisis se observa cómo la expresión del ARNm del canal va cayendo conforme ocurre el desarrollo del embrión.

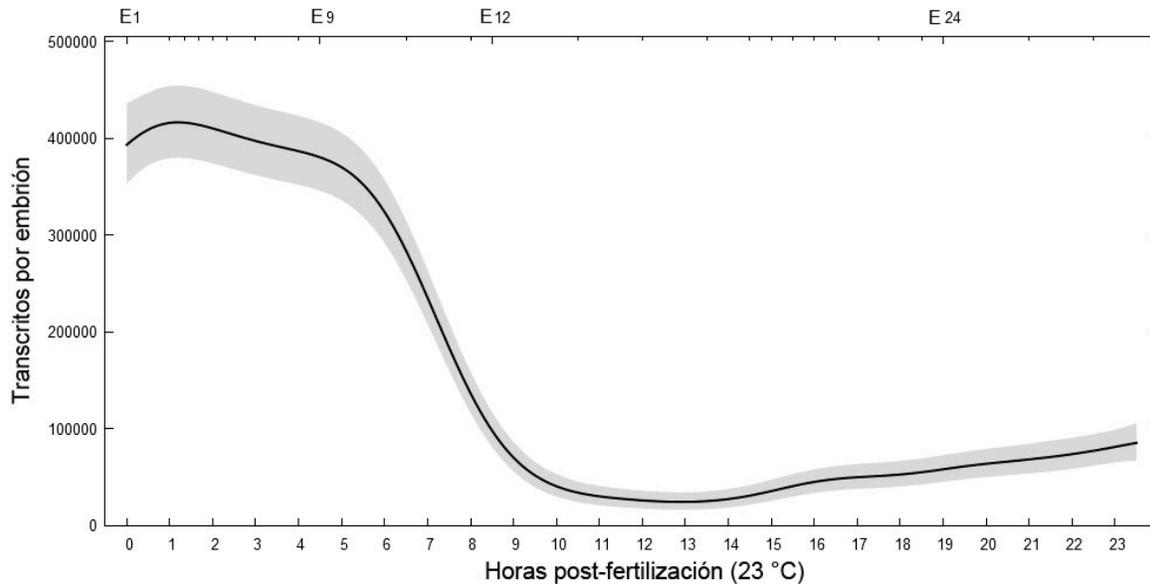


Fig. 6.22 Niveles de expresión del ARNm de GIRK5 durante las primeras 24 horas del desarrollo de los embriones de *X. laevis*. En la parte inferior de las abscisas se observan las horas que transcurren después de la fertilización a 23 °C; en la parte superior se muestra con una E la etapa del embrión a la que corresponde determinada hora. En el eje de las ordenadas se observa el nivel de transcritos por embrión.

En la gráfica de la figura 6.22 puede observarse como el nivel de transcritos por embrión tiene su nivel más alto en el estadio 1-2, aproximadamente 1 hora después de la fertilización. La expresión regresa al nivel que tenía al inicio de la fertilización y se mantiene brevemente en las primeras 4.5 horas que, a esa temperatura, corresponde al estadio 9 (blástula); después de ese tiempo, la cantidad del transcrito disminuye notablemente hasta alcanzar su nivel más bajo 12 horas después de la fertilización (etapa 13-14, néurula temprana). Sería importante determinar la localización del canal en estas etapas tempranas del desarrollo para comprobar en dónde participa en estas etapas del desarrollo.

El canal GIRK5 no es el único que se expresa en el genoma de la rana *Xenopus laevis*, también se ha localizado en las bibliotecas el canal GIRK1 y GIRK3. Sin embargo, estos canales estarían presentes en estadios más desarrollados del embrión.

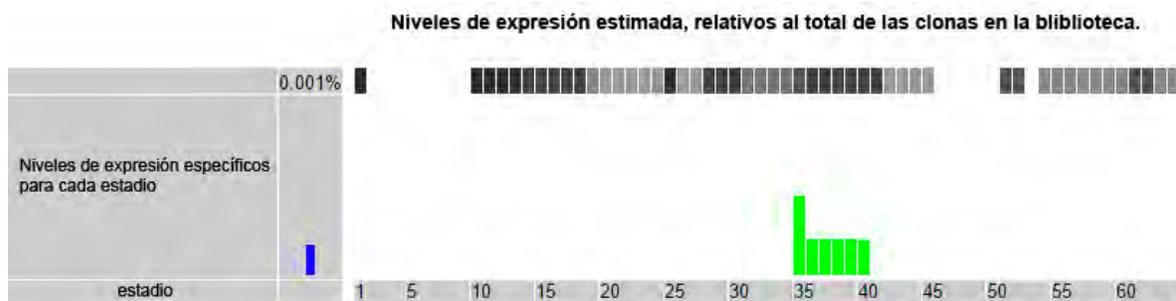


Fig. 6.23 Niveles de expresión estimada para el canal GIRK1 en los primeros 60 estadios del embrión de *X. laevis*. En azul la escala que representa un nivel de expresión del 0.001%. En verde el nivel de expresión para GIRK5 con un 0.0026% en el estadio 35 y 0.0011% en el estadio 40. El resto de los estadios no muestra clonas que expresen el ARNm del canal.

Un incremento en los niveles del ARNm del canal GIRK1 se observa después 30 horas de ocurrida la fertilización, que corresponde al estadio 35 del embrión (Fig. 6.23). En este tiempo el embrión ya se encuentra como renacuajo, y el canal GIRK1 se distribuye principalmente en su sistema nervioso (Fig. 6.24). En la rana adulta también se observa el canal GIRK1 en el cerebro (Tabla 6.1).

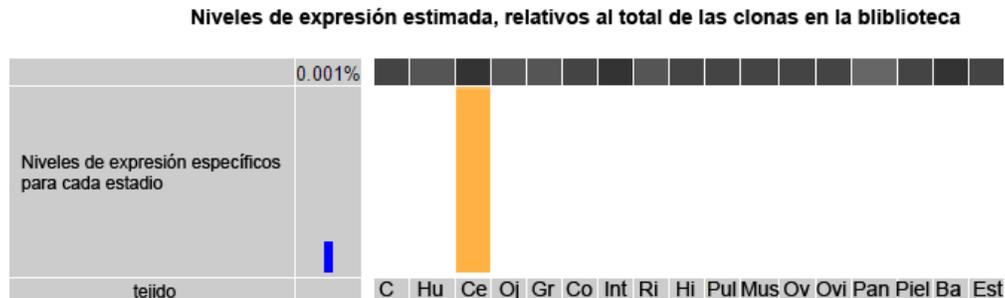


Fig. 6.24 Niveles de expresión estimada para el canal GIRK1 en diferentes órganos del embrión de *X. laevis*. En azul la escala que representa un nivel de expresión del 0.001%. En amarillo verde el nivel de expresión para GIRK1 en el cerebro (Ce) con un 0.0059%. El resto de los órganos no muestra clonas que expresen el ARNm del canal.

El canal GIRK3 también se encontró en el genoma de *X. laevis*, sin embargo éste se presenta únicamente en la rana adulta, en particular, en el sistema nervioso. En la tabla 6.1 se puede observar en dónde se han reportado la expresión del ARNm para los canales GIRK1, GIRK3 y GIRK5 en la rana *X. laevis*.

Tabla 6.1

Análisis de EST para canales GIRK en distintas etapas de desarrollo de X. laevis.

	EST		
	GIRK5	GIRK1	GIRK3
Cigoto	45 TPM	0	0
Gástrula	0	0	0
Néurula	0	0	0
Embrión	0	0	0
Renacuajo	0	12 TPM	0
Metamorfosis	0	0	0
Rana adulta	0	6 TPM	6 TPM

TPM, número de transcritos por millón. Referencias:

GIRK5: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Str.27347>

GIRK1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Str.53702>

GIRK3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Str.78086>

Con respecto a la expresión del canal GIRK1, ésta se ha relacionado con la importancia de los canales iónicos en el correcto desarrollo embrionario y además su localización es variable durante la embriogénesis [Rutenberg *et al*, 2002]. En un estudio particular, utilizando hibridación *in situ*, se localizó el ARN mensajero del GIRK1 se en medio de las células animales durante la segmentación, pero en el estadio 7-8 cambia y se localiza en los pliegues anteriores del tubo neural y también está presente alrededor del blastoporo pero durante la gastrulación (estadio 10-12). Por otra parte, el canal GIRK4 se expresa en la toda la línea primitiva en el estadio de 2 células y se restringe a la mitad anterior de la línea primitiva en el estadio 4. Además, GIRK4 se expresa en la vesícula ótica en embriones eclosionados y puede ser importante para el desarrollo del oído de las ranas adultas [Rutenberg *et al*, 2002].

En cuanto al cambio de localización de proteínas en ovocitos maduros, existen algunas proteínas, además de la ATPasa Na^+/K^+ , que se han descrito con localizaciones diferentes entre estos estadios celulares. La U-caderina [Müller *et al*, 1992] y la beta-integrina [Müller *et al*, 1993], se regulan de manera precisa (internalización) para poder permitir la liberación del ovocito de folículo ovárico y que así pueda ser ovodepositado por la rana. También se ha descrito la internalización de la ATPasa de Ca^{2+} [El-Jouni *et al*, 2008].

La proteína aPKC se encuentra tanto en el citoplasma como en la membrana de ambos polos del ovocito. Se encuentra asociada a citoesqueleto de microtúbulos y se regulan mutuamente. También regula la localización de Vangl2 que se encuentra mayoritariamente en la zona cortical del polo animal. Aunque se encuentra distribuido homogéneamente participa en la localización polarizada de algunas proteínas determinantes de la polaridad dorso/ventral como VegT y Wnt11 (proteínas del polo vegetal) y para la polaridad apical-basolateral en los ovocitos maduros y los embriones tempranos [Cha, *et al* 2011]. La proteína aPKC está distribuida homogéneamente, cuando se induce la maduración por progesterona se comienza a localizar asimétricamente en el hemisferio animal [Nakaya *et al*, 2002].

La distribución de la proteína exógena LGL en los ovocitos estadio VI de *X. laevis* muestra una distribución a través del hemisferio animal y vegetal; sin embargo, cuando los ovocitos son madurados *in vitro*, la proteína LGL se concentra en una zona cerca de la membrana plasmática en el hemisferio animal y además, se localiza en las membranas basolaterales de las células en la blástula de los embriones desarrollados. Se cree que la polaridad apical-basal es establecida en la membrana plasmática del ovocito durante la maduración [Cha *et al*, 2011], así que la localización de proteínas en ovocitos maduros puede tener un significado importante en la progresión del desarrollo, para la correcta localización de proteínas en los embriones y finalmente en la rana adulta.

Se han propuesto que los canales iónicos y las diferencias de voltaje que generan, tienen un papel importante en la dirección de la morfogénesis [ver Rutenberg, 2002]. La localización compleja de ARNm en los embriones es consistente con la idea de que la acción de esas proteínas es crucial para varios aspectos del desarrollo embrionario. Existe muy poca información sobre la distribución de bombas y los canales iónicos antes del desarrollo del sistema nervioso. Rutenberg *et al* encontraron que la expresión específica, espacio-temporal de varios ARNm de canales y bombas iónicas, sugería su participación durante la

segmentación embrionaria. Así, estudiaron los cambios de distintos canales, bombas iónicas y muestran cómo la expresión de sus ARNm es diferente entre estadios, puede cambiar o disminuir completamente (bomba Na/K-ATP, canal Kir 6.1, Kv 2.2, Kv 7.1, acuaporina 4 y 7, VATPasa, entre otros).

Para el canal GIRK5, un cambio de localización hacia la membrana plasmática implicaría tener un canal de potasio rectificador entrante en la superficie de los ovocitos maduros. Y esto podría estar relacionado con el proceso de maduración y con el papel funcional de GIRK5. Una propuesta del papel de GIRK5, es que el canal participa en la vía de transducción de señales que ocurren durante la maduración por progesterona. Esta vía es muy compleja e intervienen muchas proteínas que favorecen o inhiben distintas vías.

Aunque la presencia de receptores de progesterona en la membrana plasmática es controversial, se sabe que la incubación con andrógenos o progesterona provoca la maduración de los ovocitos [Lutz *et al*, 2002], y que estos receptores podrían estar acoplados a proteínas G. Un receptor de la familia GPR3 en ovocitos de *Xenopus*, denominado GPRx, puede mantener el arresto meiótico al incrementar los niveles de AMP cíclico por la vía de señalización de proteínas G $\beta\gamma$. Recientemente este receptor se denominó GPR185 y se considera el receptor membranal de progesterona en los ovocitos de *X. laevis* [Nader *et al*, 2014]. El mantenimiento del estado arrestado en meiosis I depende de niveles altos de AMPc, relacionados con la señalización celular de PKA. Las proteínas G $\beta\gamma$ o G α también participan en el mantenimiento del estado arrestado del ovocito inmaduro [Lutz *et al*, 2001]. La activación de la adenilato ciclasa por G α_s , o la sobreexpresión de G α_s y G $\beta\gamma$, bloquean o atenúan la maduración de los ovocitos. De la misma manera, la inyección de anticuerpos vs G α_s o el secuestro de G $\beta\gamma$ liberan el arresto meiótico.

El canal GIRK5 requiere de proteínas G $\beta\gamma$ para poder activarse y se ha demostrado que en los ovocitos su activación no requiere la activación de receptores acoplados a proteínas G, pues existe una poza de proteínas G $\beta\gamma$ libres que los pueden activar [Lutz *et al*, 2001]. Una hipótesis es que al expresarse en la membrana plasmática, el canal GIRK5 utilice esas proteínas G $\beta\gamma$ y favorezca que el ovocito pierda su arresto y progrese a meiosis II.

La otra forma en la que GIRK5 podría participar en los ovocitos maduros es en la regulación del potencial de membrana. El establecimiento del potencial de membrana en

reposo en los ovocitos maduros no es algo tan estudiado como los cambios que sufre durante el proceso de fertilización y el posterior bloqueo poli-espermico, que está relacionado con corrientes de Ca^{2+} y ha sido ampliamente estudiado. Esto puede deberse en parte, a que se ha descrito que en los ovocitos con GVBD, la conductancia de los canales de K^+ y Na^+ está muy reducida y los ovocitos son casi impermeables al flujo de estos iones antes de la fertilización [Alderdice *et al*, 1988].

En ovocitos inmaduros el potencial de membrana en reposo está alrededor de -40 a -70 [Dascal, 1984]. Y se sabe que en ovocitos del pez *Medaka* después ocurre una pequeña despolarización que permite la fertilización, posteriormente se da una hiperpolarización y después una recuperación lenta hasta alcanzar de nuevo el potencial de reposo [Alderdice *et al*, 1988].

En ovocitos maduros de erizo de mar, también se requiere una despolarización inicial, previa a la fertilización, si el potencial de membrana en reposo es menor a -20 mV se impide la entrada del primer espermatozoide.

Se sabe que en algunos casos los canales GIRK pueden permitir despolarizaciones sostenidas [Bauer *et al*, 1996] y esto explicaría la función del canal GIRK5 en la membrana del ovocito maduro, antes de permitir la entrada del espermatozoide. Pero, como estos canales se activan a voltajes más negativos que su potencial de equilibrio, lo más probable es que participen en la hiperpolarización que sigue al proceso de fertilización. Todo ese proceso es muy rápido y con muchos cambios estructurales, es por ello que la presencia del canal debería de ocurrir con antelación y estar listo para cuando la fertilización ocurra.

¿Cómo llega el canal GIRK5 a la membrana plasmática de los ovocitos maduros? Se sabe que durante el rompimiento de la vesícula germinal, ocurren varios cambios en las proteínas que conforman la red del citoesqueleto y que afectan también la disgregación del RE.

Para observar como cambiaba la disposición del RE se determinó la localización del marcador ECFP-ER en ovocitos maduros (Fig. 6.25). Tal como lo reporta Terasaki *et al* en 2001, ante la ausencia del núcleo la localización del retículo endoplásmico se observa en pequeñas acumulaciones en el citoplasma y ahora se localizan también en el polo vegetal (Fig. 6.25).

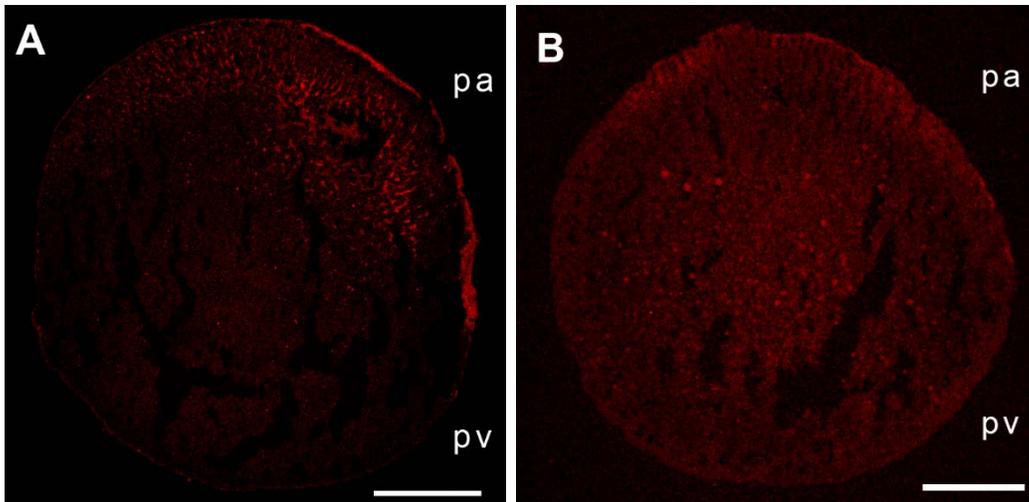


Figura 6.25 Cambios en la localización intracelular del marcador ECFP-ER. A) Microscopía confocal en ovocitos estadio VI. B) Microscopía confocal en ovocitos maduros, n=5. Polo animal (pa) arriba, polo vegetal (pv) abajo. Objetivo 10 X. Escala: 250 μ m.

En los ovocitos de *Xenopus laevis*, durante la meiosis el córtex sufre reestructuraciones. La meiosis se puede estimular con progesterona. Entonces, las LA se disgregan y dan lugar a un elaborado RE rodeando a los gránulos corticales y entrelazándose por el córtex del ovocito maduro. Estructuras porales como las de las AL subcorticales también se observan en el RE maduro [Terasaki *et al*, 2001]

Se estudió la co-localización del canal EGFP-GIRK5 con el marcador ECFP-ER y se realizaron observaciones tanto en el polo animal (Fig. 6.26) como en el polo vegetal (Fig. 6.27).

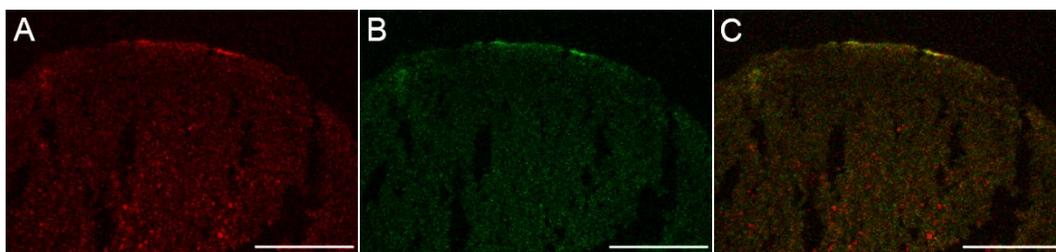


Figura 6.26 Co-expresión del canal GIRK5 –WT y el marcador ECFP-ER en el polo animal de ovocitos maduros. A) Marcador ECFP-ER en rojo. B) Canal GIRK5-WT en verde. C) *Merge* de los dos canales, se observa la co-localización sólo en la región de la membrana plasmática. Objetivo 10X. Escala 250 μ m. n=4.

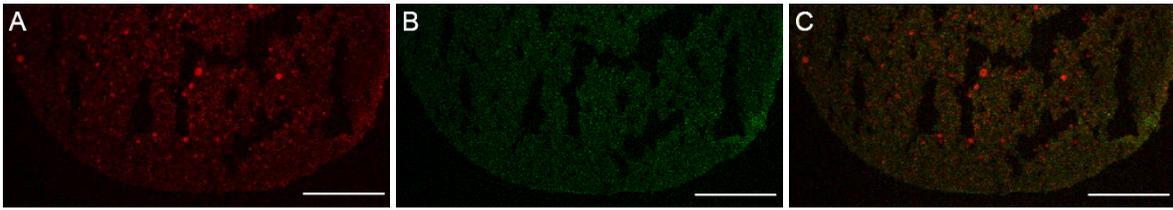


Figura 6.27 Co-expresión del canal GIRK5 –WT y el marcador ECFP-ER en el polo vegetal de ovocitos maduros. A) Marcador ECFP-ER en rojo. B) Canal GIRK5-WT en verde. C) *Merge* de los dos canales, la co-localización es casi nula. Objetivo 10X. Escala 250 μ m. n=4.

En cuanto a la presencia del canal GIRK5-WT en el RE, puede observarse que una vez maduro el ovocito, el canal no se encuentra más en el RE. El marcador de retículo endoplásmico se localiza ahora en el polo vegetal en forma de vesículas de gran tamaño, pero que ya no co-localizan con el canal (Fig. 6.27). Para este ovocito en particular, se puede apreciar en las figuras 6.26 y 6.19 que el canal GIRK5-WT está sobre todo cerca de la membrana plasmática del polo animal del ovocito maduro.

En un estudio donde se observaron los cambios en las lamelas celulares, se determinó que sus estructuras también cambiaban en los ovocitos antes de completarse su maduración. Después de 1 a 9 horas de tratamiento (pero ya no después de 12 h) con progesterona, aparecen las LA. Cerca de la vesícula germinal aparecen después numerosas vesículas. Las vesículas se hacen menores cerca del oolema del polo animal. Las vesículas no aparecen en los ovocitos control o durante las 1-9 horas del tratamiento con progesterona. Y reportan que la vesícula germinal se rompe entre las 18 y 22 horas del tratamiento con progesterona [Kessel, 1968].

Dado su papel en la formación de proteínas para los complejos nucleares y su cambio estructural en ovocitos maduros, se creía que estos organelos permiten la generación de nuevos organelos en las células una vez que se han dividido por mitosis [Rosell, 2009]. Así, una vez dividida la célula pueden reorganizarse de nuevo estas estructuras y formar las membranas del núcleo o del RE de la nueva célula.

Por último, cabe mencionar que con más frecuencia se reporta la relación de los canales iónicos con los procesos de cáncer; en particular, entre los canales de potasio, los canales

GIRK se ha descrito en células cancerosas de mama y de pulmón, pero no en células sanas (Huang, and Jan, 2014). Por otra parte, un canal rectificador entrante se describió en 2010 en ovocitos humanos (canal K_{ATP} , subunidades Kir6.1, Kir6.2, SUR2A y SUR2B). Con ese descubrimiento, Du Q *et al* proponen que por las características de estos canales, de transducir cambios metabólicos (niveles de ATP) en cambios en la excitabilidad de la membrana, el canal K_{ATP} podría regular el potencial de membrana y participar en la maduración y fertilización de los ovocitos.

Con los resultados expuestos para el canal GIRK5, observamos que su localización cambia drásticamente y se presenta en la membrana celular sin importar que antes haya estado retenido o polarizado (GIRK5-Y/A); lo cual, con todo lo descrito, sugiere que puede estar participando durante los procesos de maduración o fertilización.

7. Conclusiones y perspectivas

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio donde se determinan los motivos de tráfico que dirigen a un canal iónico endógeno en los ovocitos de *X. laevis*.

Con los resultados obtenidos durante este trabajo se lograron caracterizar las señales de tráfico del canal GIRK5 en los ovocitos de *X. laevis*. Se determinó que su retención en el RE depende de un motivo no descrito a la fecha: RKXY^(P), su polarización ocurre por un motivo de dileucina EXXXLI, su localización retículo endoplásmica se pierde en ovocitos retenidos en metafase II (donde se observa en la membrana plasmática); lo cual, junto con otros resultados sugieren un posible papel en la maduración de los ovocitos.

De manera particular:

- Se optimizó una técnica para poder obtener cortes sagitales de los ovocitos completos de *X. laevis*, donde se puede observar por microscopía confocal la localización intracelular de proteínas y marcadores expresados exógenamente.
- El ovocito puede reconocer efectivamente motivos de tráfico de proteínas hacia el RE, descritos para otros tipos celulares (como KDEL).
- Se logró observar por primera vez la distribución del RE en un ovocito completo de estadio VI de *X. laevis*. Su RE se distribuye principalmente en el espacio perinuclear, citoplasma, corteza y lamelas anulares del polo animal.
- El canal de potasio GIRK5-WT se localiza en el RE y espacio perinuclear de los ovocitos inmaduros de *X. laevis*.
- La localización en el RE se debe al motivo de retención KRXY^(P). Es el primer motivo descrito donde un motivo dibásico KR está acompañado por una tirosina río abajo, cuya fosforilación es indispensable.
- El motivo XRXY^(P) origina la salida del canal GIRK5 del retículo endoplásmico, sin lograr su arribo a la membrana plasmática.
- El canal GIRK5-Y16A se encuentra localizado en el polo vegetal de los ovocitos inmaduros de *X. laevis*.

- La polarización del canal GIRK5-Y16A ocurre de forma directa desde el espacio perinuclear hacia la membrana del polo vegetal.
- La polarización del canal GIRK5-Y16A ocurre por un motivo de dileucina del tipo EXXXLI, donde los residuos LI participan en la polarización y el residuo ácido del glutamato es indispensable para mantener la polarización.
- El canal apical ROMK también se localiza polarizadamente en el polo vegetal de los ovocitos de *X. laevis*.
- El ovocito de *X. laevis* podría ser un modelo para estudiar la polarización de proteínas.
- La localización de los canales GIRK5-WT y GIRK5-Y16A es distinta entre los ovocitos inmaduros (profase I) y los ovocitos maduros (metafase II) de *X. laevis*, se pierde la retención y la polarización, respectivamente.

PERSPECTIVAS

- Identificar las proteínas adaptadoras que reconocen las secuencias de retención y polarización estudiadas.
- Determinar si dichas secuencias son reconocidas de forma mutuamente excluyente para regular el tráfico del canal GIRK5-WT.
- Observar el efecto del silenciamiento del canal GIRK5-WT en la maduración *in vitro* de los ovocitos.
- Comprobar el estado de fosforilación del canal GIRK5-WT en los ovocitos maduros.
- Estudiar la participación del canal GIRK5-WT en la regulación del potencial de membrana, durante la maduración de los ovocitos.
- Determinar la participación del canal GIRK5-WT en la transducción de señales que ocurren durante la maduración por andrógenos.

8. Referencias

- Aidley D,** & Stanfield, PR. Ion Channels: Molecules in Action (1996) Cambridge University Press. pp.72-77.
- Alberts B,** Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2004) Molecular biology of the cell. 5a Edition. USA. Garland Science. p 1463.
- Allison R,** Czaplinski K, Git A, Adegbenro E, Stennard F, et al (2004) Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. RNA 10:1751–1763.
- Ashcroft FM** (2000) Ion Channels and Diseases : Channelopathies. New York, USA. Academic Press. p481.
- Ashcroft SJ & Ashcroft FM** (1990) Properties and functions of ATPsensitive K-channels. Cell Signal 2:197-214.
- Augustin R,** Riley J, Moley KH (2005) GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. Traffic 6:1196–212.
- Barlowe C,** Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M and Schekman R (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Cell 77:895-907.
- Barlowe C,** Schekman R (1993) SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. Nature 365:347–9.
- Barnard EA,** Miledi R, Sumikawa K (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. Pro R Soc Lond B Biol Sci 215:241–246.
- Becker BE** and Gard DL (2005) Visualization of the Cytoskeleton in *Xenopus* Oocytes and Eggs by Confocal Immunofluorescence Microscopy. Methods in Molecular Biology 322:69-86
- Biggin PC,** Roosild T & Choe S (2000) Potassium channel structure: domain by domain. Curr Opin Struct Biol 10:456–461.
- Birsén CK** (2013) ARF1 and SAR1 GTPases in Endomembrane Trafficking in Plants. International Journal of Molecular Sciences *Int. J. Mol. Sci.* 14:18181-18199
- Blobel G** & Sabatin DD (1971) Biomembranes. Manson LA, editor. Boston, MA: Springer US.
- Blobel G** (1980) Intracellular protein topogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 77:1496–500.
- Bodhinathan K** & Slesinger PA (2013) Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels. Proc Natl Acad Sci USA 110(45):18309-14.
- Bonifacino JS,** y Traub LM (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. Annu Rev Biochem 72:395-447.
- Breitfeld PP,** Casanova JE, McKinnon WC, Mostov KE (1990) Deletions in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor differentially affect endocytotic rate and postendocytotic traffic. J Biol Chem 265(23):13750-7.
- Bresnahan PA,** Yonemoto W, Ferrell S, Williams-Herman D, Geleziunas R, Greene WC (1998) A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. Curr Biol 8:1235–8.
- Byland R,** Vance PJ, Hoxie JA, Marsh M (2007) A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. Mol Biol Cell 18:414–25.
- Cha SW,** Tadjuidje E, Wylie C, Heasman J (2011) The roles of maternal Vangl2 and aPKC in *Xenopus* oocyte and embryo patterning. Development 38(18):3989-4000.
- Chan AP,** Kloc M, Larabell CA, LeGros M, Etkin LD (2007) The maternally localized RNA fatvg is required for cortical rotation and germ cell formation. Mech Dev 124:350–363.
- Chang Patrick,** Torres J, Lewis RA, Mowry KL, Houlston E, King ML (2004) Localization

- of RNAs to the Mitochondrial Cloud in *Xenopus* Oocytes through Entrapment and Association with Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 15; 4669–4681.
- Chardin P**, Paris S, Antonny B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson CL, et al (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384: 481–4.
- Chavrier P**, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62;(2): 317-329.
- Chen HJ**, Yuan J, Lobel P (1997) Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting. *J Biol Chem* 14;272(11):7003-12.
- Chen WJ**, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 25;265(6):3116-23.
- Choe S** (2002) Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3:115–21.
- Chung HJ**, Qian X, Ehlers M, Jan YN, Jan LY (2009) Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:629–634.
- Colgan L**, Liu H, Huang SY, Liu Y-J (2007) Dileucine motif is sufficient for internalization and synaptic vesicle targeting of vesicular acetylcholine transporter. *Traffic* 8:512–22.
- Corey S** & Clapham DE (1998) Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ (GIRK4) channel homomultimers. *J Biol Chem* 273(42):27499-504.
- Corzo J** (2005) Transporte a través de membranas. 1. Poros y canales. Universidad de La Laguna, España. Disponible en: <http://www.biorom.uma.es/contenido/JCorzo/t emascompletos/transporte/Clase%201.htm> [Revisado: 25 julio 2015].
- Costa PF**, Emilio MG, Fernandes PL, Ferreira HG, Ferreira KG (1989) Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol* 413:199-211.
- DeCoursey TE**, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD (1984) Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 2-8;307(5950):465-468.
- Deshler JO**, Highett MI, Schnapp BJ (1997) Localization of *Xenopus* Vgl mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 276(5315):1128-31.
- Dhar MS**, Plummer HK (2006) Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiol* 6:8.
- Díaz Bello**, Beatriz (2007) Localización del canal de potasio GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Tesis (Lic. Química Farmacéutica Biológica). México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Pág. 60.
- Díaz-Bello B**, Rangel-García CI, Salvador C, Escobar LI (2010) A New Dibasic ER Retention Motif in a GIRK Potassium Channel from *Xenopus* oocytes. En: American Society of Cell Biology, Annual Meeting, (50° ed, Philadelphia, USA) 11-15 dic.
- Do H**, Falcone D, Lin J, Andrews DW, Johnson AE (1996) The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* 85:369–78.
- Douppnik CA**, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of gbetagamma-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(19):10461-6.
- Doyle DA**, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69–77.

- Du Q**, Jovanović S, Sukhodub A, Barratt E, Drew E, Whalley KM, Jovanović A (2010) Human oocytes express ATP-sensitive K⁺ channels. *Human Reproduction* (Oxford, England) 25(11):2774–82
- Dumont JN** (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136 (2):153-79.
- El Nemer W**, Yves C, Bauvy C, Patrice C, Fraser R, Cartron JP, and Le Van Kim C (1999) Isoforms of the Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule Glycoprotein Are Differentially Delivered in Polarized Epithelial Cells. Mapping of the basolateral sorting signal to a cytoplasmic di-leucine motif. *The Journal of Biological Chemistry* 274;45(5):31903–31908.
- El-Jouni W**, Haun S, Machaca K. (2008) Internalization of plasma membrane Ca²⁺-ATPase during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* 324(1):99-107.
- Ezkurdia I**, Juan D, Jose Manuel Rodriguez, Frankish A, Diekhans M, Harro J, Vazquez J, Valencia A, Tress ML (2014) The Shrinking Human Protein Coding Complement: Are There Fewer Than 20,000. *Arxiv. Quantitative Biology eprint arXiv:1312.7111*
- Ficker E**, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 11;266(5187):1068-72
- Francis MJ**, Jones EE, Levy ER, Martin RL, Ponnambalam S, Monaco AP (1999) Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci* 112:1721–1732.
- Gao C**, Cai Y, Wang Y, Kang BH, Aniento F, Robinson DG, Jiang L (2014) Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. *Trends Plant Sci* 19(8):508-15.
- Gard DL & Kropf DL** (1993) Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules in oocytes, eggs, and embryos of algae and amphibians. *Methods Cell Biol* 37:147-69.
- Gard DL** (1999) Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes. *Microscopy research and technique* 44:388–414.
- Gard DL**, Cha BJ, King E (1997) The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Dev Biol* 184(1):95-114.
- Gard, DL** (1993) Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules in amphibian oocytes and eggs. *Methods Cell Biol* 38:241–264.
- Gard, DL** (2002) Confocal fluorescence microscopy of the cytoskeleton of amphibian oocytes and embryos. *Methods Cell Biol* 70:379–416.
- Gouaux E**, MacKinnon R (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461–5.
- Grasser E**, Steinecker B, Ahammer H, Schreibmayer W (2008) Subunit stoichiometry of heterologously expressed G-protein activated inwardly rectifying potassium channels analysed by fluorescence intensity ratio measurement. *Pflugers Arch* 455(6):1017-24.
- Greenberg M**, DeTulleo L, Rapoport I, Skowronski J, Kirchhausen T (1998) A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol* 8:1239–42.
- Gürkan C**, Stagg SM, LaPointe P, Balch WE (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:727-738.
- Gutman GA**, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Randy S. Wymore International Union of Pharmacology. XLI. (2003) Compendium of

- Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels Pharmacological Reviews 55(4):583-586.
- Hagiwara S** & Takahashi K (1974) The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell The Journal of Membrane Biology 18(1):61-80.
- Hagiwara S**, Miyazaki S, Moody W, Patlak J. (1978) Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. J Physiol 279:167-85.
- Hagiwara S**, Miyazaki S, Rosenthal NP. (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. J Gen Physiol 67(6):621-38.
- Hedin KE**, Lim NF, Clapham DE (1996) Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of IKACH currents in oocytes. Neuron 16:423-9.
- Heilker R**, Manning-Krieg U, Zuber JF, Spiess M (1996) In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. EMBO J 15:2893-9.
- Herman MA**, Sidhu H, Stouffer DG, Kreifeldt M, Le D, Cates-Gatto C, et al (2015) GIRK3 gates activation of the mesolimbic dopaminergic pathway by ethanol. Proc Natl Acad Sci USA 112:7091-6.
- HGNC¹**: Canales iónicos: <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/177> [revisado: 30 de octubre, 2015].
- HGNC²**: Canales de potasio: <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/183> [revisado: 30 de octubre, 2015].
- Hibino H**, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. Physiol Rev 90(1):291-366.
- Hille B** (2001) Ionic Channels of Excitable Membranes. Third edition. USA, Sinauer Associates. p 314.
- Huang CL**, Feng S, Higemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G-beta-gamma. Nature 391(6669):803-807.
- Huang X** & Jan LY (2014) Targeting potassium channels in cancer. J Cell Biol 206:151-162.
- Hunziker W** & Fumey C (2004) A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. EMBO J 13:2963-2969.
- Inanobe A**, Horio Y, Fujita A, Tanemoto M, Hibino H, Inageda K, Kurachi Y (1999) Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. J. Physiol 521:19-30.
- Inanobe A**, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999) Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. J Neurosci 19:1006-1017.
- IUPHAR/BPS** Guide to PHARMACOLOGY, Potassium channels. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=133> [Revisado: 17 de mayo, 2015].
- Jackson MR**, Nilsson T, Peterson PA (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol 121:317-33.
- Jadot M**, Canfield WM, Gregory W, Kornfeld S (1992) Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. J Biol Chem 267(16):11069-77.
- Jelacic TM**, Sims SM, Clapham DE (1999) Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. J Membr Biol 169:123-9.

- Jiang Y**, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 30; 417(6888):515-22.
- Jiang Y**, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 1; 423(6935):33-41.
- Johnson KF**, Kornfeld S (1992) The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* 119(2):249-57.
- Kaiser C** (2000) Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3783-5.
- Kaler SG** (1998) Metabolic and molecular bases of Menkes disease and occipital horn syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 1:85-98.
- Kappeler F**, Klopfenstein DR, Foguet M, Paccaud JP, Hauri HP (1997) The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem* 272: 31801-8.
- Kennedy ME**, Nemeč J, Corey S, Wickman K, Clapham DE (1999) GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein gated potassium channels. *J Biol Chem* 274:2571-82.
- Kessel RG** (1968) Fine structure of annulate lamellae. *J Cell Biol* 36(3):658-63.
- King ML**, Messitt TJ, Mowry KL (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell* 97: 19-33.
- Kloc M** & Etkin LD (1998) Apparent continuity between the messenger transport organizer and late RNA localization pathways during oogenesis in *Xenopus*. *Mechanisms of Development* 73:95-106.
- Kloc M** & Kubiak ZJ (2014) *Xenopus* Development. Wiley-Blackwell, EUA. Pág. 424.
- Kloc M**, Bilinski S, Chan AP, Allen LH, Zearfoss NR, Etkin LD (2001) RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* 203: 63-91.
- Kloc M**, Bilinski S, Chan AP, Etkin LD (2001) Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation* 67:80-83.
- Kloc M**, Etkin LD (2005) RNA localization mechanisms in oocytes. *J Cell Sci* 118:269-282.
- Kobayashi T**, Ikeda K, Kojima H, Niki H, Yano R, Yoshioka T, Kumanishi T (1999) Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nat Neurosci* 2(12):1091-7.
- Kobayashi T**, Ikeda K, Kumanishi T (2002) Functional characterization of an endogenous *Xenopus* oocyte adenosine receptor. *Br J Pharmacol* 135(2):313-22.
- Kobayashi T**, Washiyama K, Ikeda K (2004) Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology* 29(10):1841-51.
- Kofuji P**, Davidson N, Lester HA (1995) Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci USA* Jul 3;92(14):6542-6.
- Krapivinsky G**, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* 374 (6518):135-141.
- Kubo Y**, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 11;362(6416):127-33.
- Kurachi Y** (1985) Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J Physiol* 366: 365-385.

- Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot JP** (1994) Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Lett* 10;353(1):37-42.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M** (1995) Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 270(48):28660-7.
- Letourneur F & Klausner RD** (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-57.
- Levitan I B & Kaczmarek LK** (2002) *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. Third edition. Oxford University Press, New York. Pág. 603.
- Lewohl JM, Wilson WR, Mayfield RD, Brozowski SJ, Morrisett RA, Harris RA** (1999) G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nat Neurosci* 2(12):1084-90.
- Littleton JT & Ganetzky B** (2000) *Ion Channels and Synaptic Organization*. Neuron. Elsevier 26:35-43.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE** (2000) *Biología celular y molecular*. 4ª edición. Editorial Panamericana S.A., Madrid España pp 1784, 675-706.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE** (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325(6102):321-6.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG** (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372(6504):366-9.
- Lothhammer N, Matte C, Cruz P F, Sehn F, Fernandes MC** (2009) *Biología Celular – Atlas Digital*. Porto Alegre, Brasil: UFRGS/UFCSPA Disponible en: <http://www.ufrgs.br/biologiaceleularatlas/nucleo.htm>
- Lovell PV, Carleton JB, Mello CV** (2013) Genomics analysis of potassium channel genes in songbirds reveals molecular specializations of brain circuits for the maintenance and production of learned vocalizations. *BMC genomics* 14(1):470.
- Lu Z & MacKinnon R** (1994) Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature* 371(6494):243-6.
- Lüscher C & Slesinger PA** (2010) Emerging concepts for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11(5):301-315.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA** (1997) G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic, but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
- Lutz LB, Kim B, Jahani D, Hammes SR** (2000) G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J Biol Chem* 275:41512-20.
- Ma D & Jan LY** (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol* 12(3):287-92.
- Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY** (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291(5502):316-9.
- Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY** (2002) Diverse Trafficking Patterns Due to Multiple Traffic Motifs in G Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channels from Brain and Heart. *Neuron* 33:715-729.
- Machaca K, Hartzell HC** (1998) Asymmetrical distribution of Ca-activated Cl channels in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 74:1286-1295.

- Malhotra V**, Serafini T, Orci L, Shepherd JC, Rothman JE (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58:329–36.
- Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pág. 545.
- Marchant JS**, Ramos V, Parker I (2002) Structural and functional relationships between Ca^{2+} puffs and mitochondria in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(6):C1374–86.
- Marco Aldo** (2003) Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. Munibe (suplemento) no.16, pág. 44-55. San Sebastián. España. Disponible en: <http://www.euskomedia.org/PDFAnlt/munibe/2004044055.pdf>
- Marsh M** & McMahon HT (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285:215–20.
- Martoglio B** & Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8:410–5.
- Matsuda H**, Saigusa A, Irisawa H (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 325(7000):156–9.
- Matter K**, Yamamoto EM, Mellman I. (1994) Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* 126(4):991–1004.
- Menkes JHM**, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, Sung JH (1962) A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29:764–779.
- Merriam RW**, Sauterer RA, Christensen K (1983) A subcortical, pigment containing structure in *Xenopus* eggs with contractile properties. *Dev Biol* 95: 439–446.
- Michelsen K**, Yuan H, Schwappach B (2005) Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* 6(8):717–22.
- Miledi R** & Sumikawa K (1982) Synthesis of cat muscle acetylcholine receptors by *Xenopus* oocytes. *Biochemical Research* 3:390–399.
- Miller C** (2001) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 1:Reviews 0004.
- Miller JR**, Rowning BA, Larabell CA, Yang-Snyder JA, Bates RL, et al (1999) Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* 146:427–437.
- Miranda KC**, Khromykh T, Christy P, Le TL, Gottardi CJ, Yap AS, Stow JL, Teasdale RD (2001) A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J Biol Chem* 276:22565–22572.
- Mogami Y** & Baba SA (1998) Super-helix model: A physiological model for gravitaxis of paramecium. *Adv Sp Res* 21:1291–1300.
- Mohanty BK**, Gupta BL (2012) A marked animal-vegetal polarity in the localization of Na^{+} , K^{+} -ATPase activity and its down-regulation following progesterone-induced maturation. *Mol Reprod Dev* 79: 138–160.
- Montanari, T** (2013) Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre. Disponible en: <http://www.ufrgs.br/livrodeembrio>.
- Morais-cabral JH**, Zhou Y, MacKinnon R (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K^{+} selectivity filter. *Nature* 414:37–42.
- Morgan AD**, Carroll ME, Loth AK, Stoffel M, Wickman K (2003) Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 28:932–938.
- Morris R** & Hadzovic A (2011) A Tour of K^{+} Channels. Disponible en: <http://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/GT/M/JM/kchannel/start.htm> [Revisado: 24 agosto, 2015].

- Mulatero P**, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA (2013) Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nature Reviews Endocrinology* 9: 104-112.
- Müller AH**, Angres B, Hausen P (1992) U-cadherin in *Xenopus* oogenesis and oocyte maturation. *Development* 114(2):533-43.
- Müller AH**, Gawantka V, Ding X, Hausen P. (1993) Maturation induced internalization of beta 1-integrin by *Xenopus* oocytes and formation of the maternal integrin pool. *Mech Development* 42(1-2):77-88.
- Nader N**, Dib M1, Daalis A1, Kulkarni RP1, Machaca K2 (2014) Role for endocytosis of a constitutively active GPCR (GPR185) in releasing vertebrate oocyte meiotic arrest. *Dev Biol* 395(2):355-66.
- Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T, Tanaka H, Miura K (2008) Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 36(3):861-71.
- Nakatsu F** & Ohno H (2003) Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Structure and Function* 28: 419-429.
- Nakaya M**, Fukui A, Izumi Y, Akimoto K, Asashima M, Ohno S. (2000) Meiotic maturation induces animal-vegetal asymmetric distribution of aPKC and ASIP/PAR-3 in *Xenopus* oocytes. *Development* 127, 5021-5031
- Newman EA** (1993) Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci* 13(8):3333-45.
- Newton EE**, Wu Z, Simister NE. (2005) Characterization of basolateral-targeting signals in the neonatal Fc receptor. *J Cell Sci* 118: 2461-9.
- Nishida M** & MacKinnon R (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 111(7):957-65.
- Nishimura N** & Balch WE (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277(5325):556-8.
- North RA** (1989) Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br J Pharmacol* 98(1):13-28.
- Nufer O** & Hauri HP (2003) ER Export: Call 14-3-3. *Current Biology* 13:R391-R393.
- Nufer O**, Guldbrandsen S, Degen M, Kappeler F, Paccaud J-P, Tani K, et al (2002) Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci* 115: 619-28.
- O'Kelly I**, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111(4):577-88.
- Oki K**, Plonczynski MW, Lam ML, Gomez-Sanchez EP & Gomez-Sanchez CE (2012) The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology* 153:4328-4335.
- Orci L**, Palmer DJ, Ravazzola M, Perrelet A, Amherdt M, Rothman JE (1993) Budding from Golgi membranes requires the coatamer complex of non-clathrin coat proteins. *Nature* 362:648-52.
- Pearson RB** & Kemp BE (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 200:62-81.
- Pelham HR** (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* 21(5):413-9.
- Peter AB**, Schittny JC, Niggli V, Reuter H, Sigel E (1991) The polarized distribution of poly(A⁺)-mRNA-induced functional ion channels in the *Xenopus* oocyte plasma membrane is prevented by anticytoskeletal drugs. *J Cell Biol* 114: 455-464.
- Pfaffinger PJ**, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NM, Hille B (1985) GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature* 317(6037):536-8.

- Plummer** HK, Dhar MS, Cekanova M, Schuller HM (2005) Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC Cancer* 5:104.
- Plummer** HK, Yu Q, Cakir Y, Schuller HM (2004) Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 4:93.
- Pollard** TD, Earnshaw WC & Lippincott-Schwartz J (2008) *Cell Biology*. 2nd edición. China. Elsevier Inc. Pág. 905.
- Pond** L, Kuhn LA, Teyton L, Schutze MP, Tainer JA, Jackson MR, Peterson PA (1995) A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 270(34):19989-97.
- Popescu** BF, Belak ZR, Ignatyev K, Ovsenek N, Nichol H (2007) Asymmetric distribution of metals in the *Xenopus laevis* oocyte: a synchrotron X-ray fluorescence microprobe study. *Biochem Cell Biol* 85(5):537-42.
- Poulsen** JH & Williams JA (1976) Spontaneous repetitive hyperpolarisations from cells in the rat adenohypophysis. *Nature* 263:156-158.
- Ptacek** LJ & Fu YH (2004) Channels and disease: past, present, and future. *Arch Neurol* 61:1665-8.
- Quayle** JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT (1993) Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265(5 Pt 1):C1363-70.
- Rai** T, Sasaki S & Uchida S (2006) Polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an NH₂-terminal sorting signal. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 290:C298-304.
- Rangel** García, Claudia Iveth (2013) Identificación de un motivo de dileucina en el canal de potasio GIRK5. Estudio por fijación de voltaje con dos microelectrodos en ovocitos de *X. laevis*. Tesis (Maestría en Ciencias). México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México. Pág. 86.
- Rangel-García** CI, Díaz-Bello B, Salvador C, Escobar LI (2014) Identification of an arginine-phospho tyrosine based endoplasmic retention motif in a G-protein activated potassium channel En: Sociedad Mexicana de Bioquímica, Congreso Nacional de Bioquímica (30° ed, Guadalajara, México) 2-8 nov.
- Renigunta** V, Yuan H, Zuzarte M, Rinné S, Koch A, Wischmeyer E, Schlichthörl G, Gao Y, Karschin A, Jacob R, Schwappach B, Daut J, Preisig-Müller R (2006) The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* 7(2):168-81.
- Reuveny** E, Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iñiguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 370(6485):143-6.
- Robertson** JL, Palmer LG & Roux B (2012) Multi-Ion Distributions in the Cytoplasmic Domain of Inward Rectifier Potassium Channels. *Biophysical Journal* 103 (3), 8:434-443.
- Rohn** WM, Rouillé Y, Waguri S, Hoflack B (2000) Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci* 113 (Pt 1: 2093-101).
- Rosell** A. Lamelas anulares. 2009. Disponible en <http://lamelas-anulares.galeon.com/> [Revisado: el 20 de diciembre, 2015].
- Rutenberg** J, Cheng SM, Levin M (2002) Early embryonic expression of ion channels and pumps in chick and *Xenopus* development. *Dev Dyn*. 225(4):469-84.
- Sabatini** DD & Blobel G (1971) Ribosome-Membrane Interaction in Eukaryotic Cells. In: Lionel A. Manson, compiler. *Biomembranes*. US, Springers. pp 193-195.
- Sakmann** B & Trube G (1984) Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 347:641-657.

- Sambrook J**, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Vol 1, 2 y 3. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. EUA.
- Sandhiya S** & Dkhar SA (2009) Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* 129(3):223-32.
- Sanguinetti MC**, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81:299-307.
- Schekman R** & Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271:1526-33.
- Schenzer A**, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grotzinger J, *et al* (2005) Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci* 25:5051-60.
- Schmid SL** (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66:511-48.
- Schreiner R**, Frindt G, Diaz F, Carvajal-Gonzalez JM, Perez Bay AE, Palmer LG, Marshansky V, Brown D, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E (2010) The absence of a clathrin adapter confers unique polarity essential to proximal tubule function. *Kidney Int* 78(4):382-8.
- Scott F** (2005) *Biología del desarrollo Edición: 7ª China*. Pág. 882.
- Seabold GK**, Wang PY, Petralia RS, Chang K, Zhou A, *et al* (2012) Dileucine and PDZ-binding motifs mediate synaptic adhesion-like molecule 1 (SALM1) trafficking in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287:4470-4484.
- Sergei IB**, Nishimura N, Balch WE (1998) Getting into the Golgi. *Trends in Cell Biology*. 8(1):21-25.
- Shankar H**, Kahner BN, Prabhakar J, Lakhani P, Kim S, Kunapuli SP (2006) G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels regulate ADP-induced cPLA2 activity in platelets through Src family kinases. *Blood* 108(9):3027-34.
- Shi G**, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS (1996) Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* 16:843-852.
- Shieh CC**, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities *Pharmacol Rev*. 52(4):557-594.
- Shuck ME**, Piser TM, Bock JH, Slightom JL, Lee KS, Bienkowski MJ (1997) Cloning and characterization of two K⁺ inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3). *J Biol Chem* 272(1):586-93.
- Simmen T**, Schmidt A, Hunziker W, Beermann F (1999) The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J Cell Sci* 112(Pt 1):45-53.
- Slesinger PA**, Patil N, Liao YJ, Jan YN, Jan LY, Cox DR (1996) Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuron* 16(2):321-31.
- Sokol SY**, Klingensmith J, Perrimon N, Itoh K (1995) Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed *Xenopus* homolog of dishevelled. *Development* 121:3487.
- Soltys BJ** & Gupta RS (1992) Interrelationships of endoplasmic reticulum, mitochondria, intermediate filaments, and microtubules--a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem Cell Biol* 70(10-11):1174-86.
- Sönnichsen B**, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149(4):901-14.

- Stagg SM, Gürkan M, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE** (2006) Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 234-238.
- Stebbins RC & Cohen NW** (1995) *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. EUA. Pág. 316.
- Stenmark H** (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513–25.
- Stühmer W** (1998) [16] Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. Artículo en METHODS IN ENZYMOLOGY 293:280-300.
- Sugaya N, Kobayashi T & Ikeda K** (2013) Role of GIRK Channels in Addictive Substance Effects. *Journal of Drug and Alcohol Research* 2:art235823, 11 pág.
- Tamargo J** (2004) Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *An R Acad Nac Farm* 70:9-31.
- Tanigawa G, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Helms JB, Rothman JE** (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 123:1365–71.
- Terasaki M** (2000) Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol Biol Cell* 11(3):897-914.
- Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K** (1986) Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103(4):1557-68.
- Terasaki M, Jaffe LA, Hunnicutt GR, Hammer JA 3rd** (1996) Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using the green fluorescent protein. *Dev Biol* 179(2):320-8.
- Terasaki M, Runft LL, Hand AR** (2001) Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol Biol Cell* 12(4):1103-16.
- Tester M** (1990) Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies. *New Phytol* 114, 305-340.
- Theos CA, Tenza D, Martina JA, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya EV, Stewart A, Robinson MS, Bennett DC, Cutler DF, Bonifacino JS, Marks MS and Raposo G** (2005) Functions of Adaptor Protein (AP)-3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes. *Mol Biol Cell* 16(11): 5356–5372.
- Thyberg J & Moskalewski S** (1998) Partitioning of cytoplasmic organelles during mitosis with special reference to the Golgi complex. *Microsc Res Tech* 40: 354–68.
- Tortorella LL, Schapiro FB, Maxfield FR** (2007) Role of an acidic cluster/dileucine motif in cation-independent mannose 6-phosphate receptor traffic. *Traffic* 8: 402–13.
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, et al.** Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*. 1995;378: 632–5.
- Van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL** (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122: 553–63.
- van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA** (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 83:1–45.
- Vandenberg CA** (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8):2560-4.
- Vázquez Cruz, María de Lourdes** (2013) Efecto de un canal de potasio en el ciclo celular. Tesis (Lic. Biología). México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Pág. 47.
- Visnovitz T, Világi I, Varró P, Kristóf Z** (2007) Mechanoreceptor Cells on the Tertiary Pulvini of *Mimosa pudica* L. *Plant Signal Behav* 2:462–6.

- Volkov AG, Foster JC, Markin VS (2010)** Signal transduction in *Mimosa pudica*: biologically closed electrical circuitspace. *Plant, Cell and Environment* 33:816–827.
- Volkov AG, O'Neal L, Volkova MI, Markin VS (2013)** Morphing structures and signal transduction in *Mimosa pudica* L. induced by localized thermal stress. *J Plant Physiol* 170(15):1317–27.
- Walter P & Johnson AE (1994)** Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87–119.
- Weber W (1999)** Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421:213–233.
- Whorton MR & MacKinnon R (2011)** Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K⁺ Channel and Gating Regulation by G-Proteins, PIP2 and Sodium. *Cell* 147(1):199–208.
- Whorton MR & MacKinnon R (2013)** X-ray structure of the mammalian GIRK2- $\beta\gamma$ G-protein complex. *Nature* 498:190–197.
- Wickman K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE (1998)** Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 20(1):103–14.
- Wu CF, Wang R, Liang Q, Liang J, Li W, Jung SY, Qin J, Lin SH, Kuang J.** Dissecting the M phase-specific phosphorylation of serine-proline or threonine-proline motifs. *Mol Biol Cell*. 2010 May 1;21(9):1470–81.
- Wyss S, Berlioz-Torrent C, Boge M, Blot G, Höning S, Benarous R, et al (2001)** The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]. *J Virol* 75: 2982–92.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997)** The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91(7):961–71.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (1998)** G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 50:723–60.
- Yoshihisa T, Barlowe C, Schekman R (1993)** Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259:1466–8.
- Yuan H, Michelsen K, Schwappach B (2003)** 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* 13(8):638–46.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN & Jan LY (1999)** A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane KATP channels. *Neuron* 22:537–548.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A & MacKinnon R (2001)** Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43–48.
- Zuzarte M, Heusser K, Renigunta V, Schlichthörl G, Rinné S, Wischmeyer E, Daut J, Schwappach B, Preisig-Müller R (2009)** Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* 587(Pt 5):929–52.

I Apéndice

i. Formulación de soluciones

Gel Agarosa 1% para ADN.

Agarosa 0.3 g

TBE1X 30 ml

Bromuro de etidio 1.4 μ l

Solución amortiguadora TBE.

- Stock 1X (sol de trabajo)

- Tris base 89 mM

- Ácido bórico 89 mM

- EDTA 0.5 M pH 8.0 2 mM

Colorante para elusión en gel (ADN).

Azul de bromofenol 0.25%

Xileno cianol FF 0.25%

Glicerol en agua 30%

Guardar a 4° C.

Gel Agarosa ARN.

0.3g de agarosa en 30 ml de H₂O.

3 ml de MOPS 10X.

1.5 ml de formaldehído.

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

MOPS 10X.

MOPS (libre de ácido) 41.86 g 0.4 M

Acetato de sodio 6.8 g 0.1 M

EDTA 0.5 M pH 8.0 20 ml 0.01 M

Llevar a pH 8.0 con 6.8 ml de NaOH 10N.

Filtrar y

guardar a 4° C cubierto con aluminio.

Solución amortiguadora de lisis.

Sacarosa 250 mM

EDTA 1 mM

TRIS 10 mM

Ajustar pH 7.6

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

Geles de acrilamida.

Gel concentrador, 5% acrilamida

H₂O 3.4 ml

30% acrilamida 830 μ l

1 M Tris-HCl (pH 6.8) 630 μ l

10 % SDS 50 μ l

10% APS 50 μ l

TEMED 5 μ l

Gel separador, 10% acrilamida

H₂O 4.0 ml

30% acrilamida 3.3 ml

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml

10 % SDS 100 μ l

10% APS 100 μ l

TEMED 4 μ l

Los valores reportados son para la preparación de dos geles.

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

Buffer de carga Laemli.

Tris -HCl, pH 6.8 62.5 mM

Glicerol 25 %

SDS 2 %

Azul de bromofenol 0.01 %

β -mercaptoetanol 5%

Buffer de electroforesis Tris-glicina.

Tris base 25 mM

Glicina 250 mM

SDS 0.1 %

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

Solución de transferencia.

Tris base 25 mM

Glicina 250 mM

SDS 0.1 %

Metanol 20 %

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

Solución amortiguadora TBS.

NaCl 137 mM

Tris base 20 mM

Ajustar pH a 7.6

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

Medio ND96 pH= 7.5 con NaOH 1M

NaCl 96 mM

KCl₂ 2 mM

CaCl₂ 1.8 mM

MgCl₂ 1 mM

Piruvato de Na⁺ 2 mM

HEPES 5 mM

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

Solución A H₂NaPO₄.2H₂O 0.2M

Solución B Na₂HPO₄.7H₂O 0.2M

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

PBS 0.02 M pH=7.4

PB 0.2M 100 mL

NaCl 8.76 g

KCl 0.2 g

H₂O cbp 1000 mL

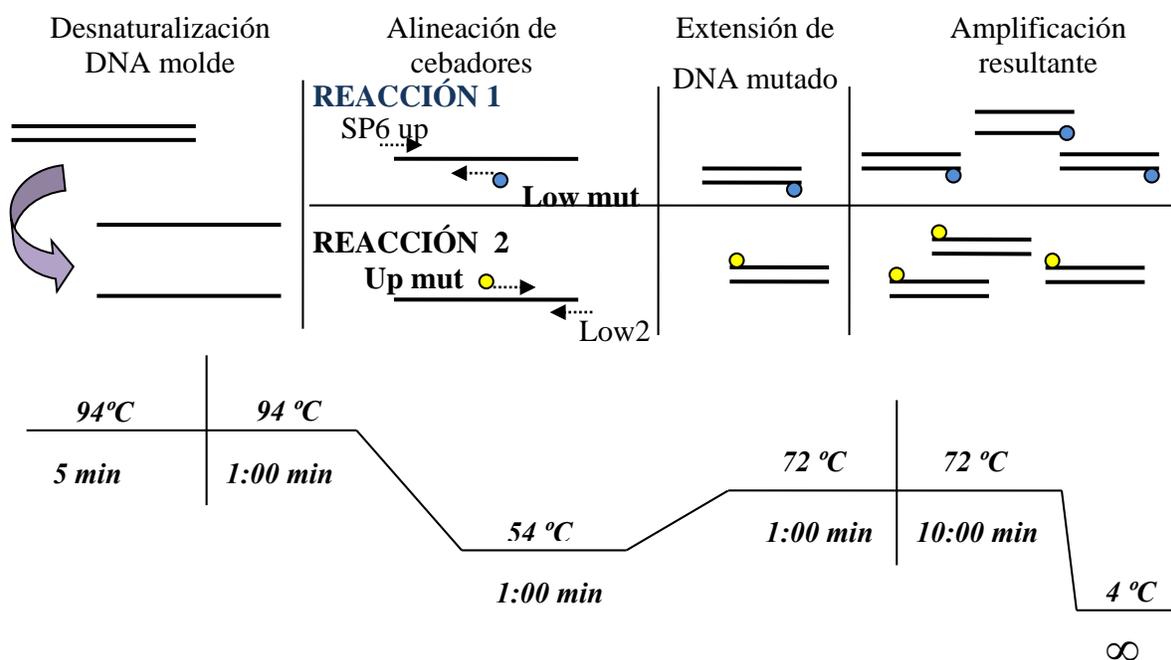
ii. Mutagénesis dirigida

Tabla I

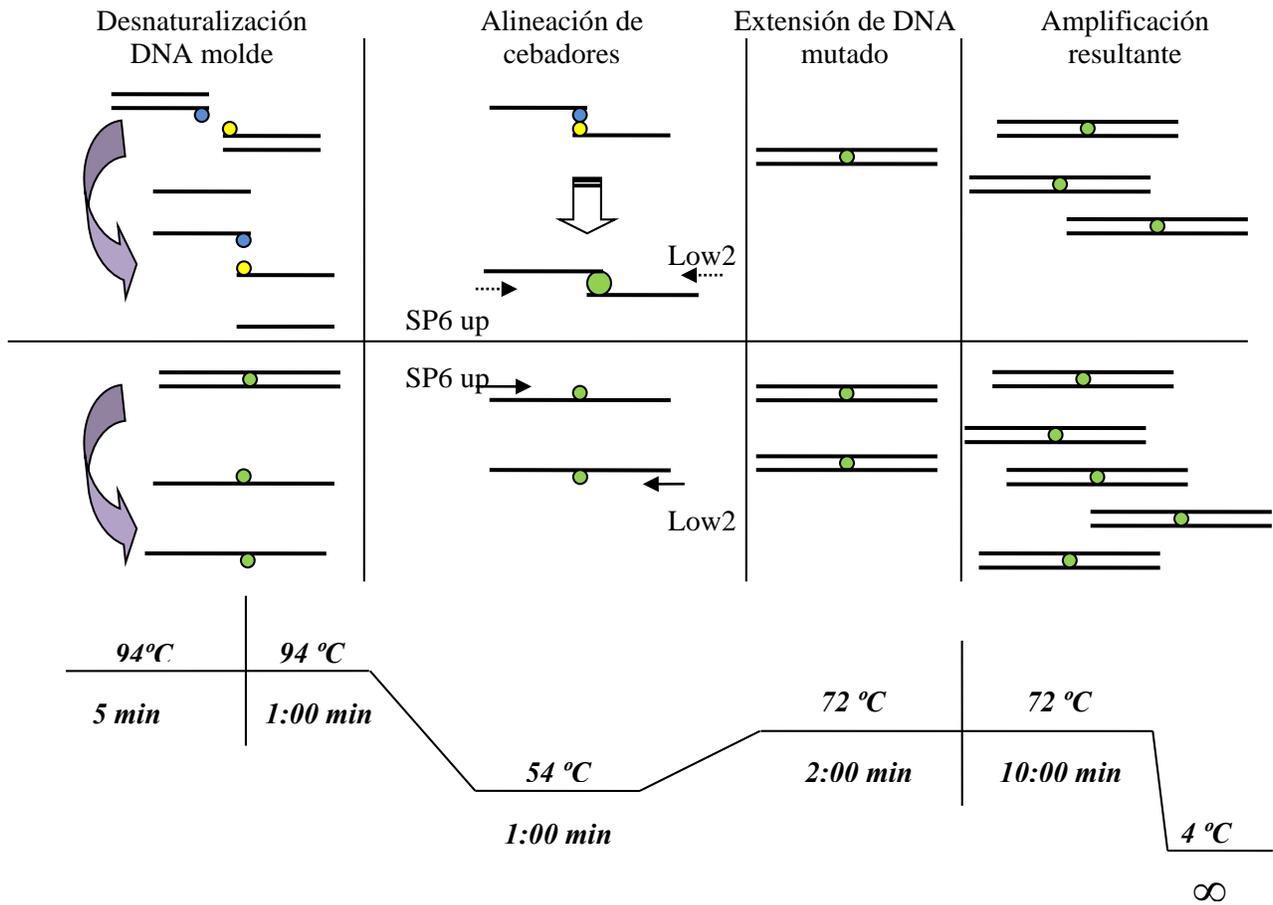
Cebadores utilizados para la mutagénesis.

Construcción	Secuencia del oligonucleótido
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
LOW 2	5' AGAGACCAAAAAGAGACGATCGTCGCCTGTATCAA 3'
GIRK5-KR/AA	5' CCTCAGTGGGCAGCATTGTATG 3' (sentido) 5' CATACAATGCTGCCCACTGAGG 3' (antisentido)
GIRK5-K13A	5' CCTCAGTGGGCAAGATTGTATG 3' (sentido) 5' CATACAATCTTGCCCACTGAGG 3' (antisentido)
GIRK5-R14A	5' CAGTGGAAAGCATTGTATGAG 3' (sentido) 5' CTCATACAATGCTTTCCACTG 3' (antisentido)
GIRK5-YLI/AAA Templado: GIRK5-Y16A	5' GAGTCACCACAAGCCGCCCAAACCATCATGGC 3' (sentido) 5' GCCATGATGGTTTGGGCGGCTTGTGGTGACTC 3' (antisentido)
GIRK5-YELI/AAAA Templado: GIRK5-YLI/AAA	5' AAGATTGGCTGCGTCACC 3' (sentido) 5' GGTGACGCAGCCAATCTT 3' (antisentido)

Reacciones 1 y 2 de PCR



Reacción 3 de PCR



Composición y volúmenes de la primera y segunda reacción de PCR

Volumen de reacción: 50µL

No. de ciclos: 40

Mezcla de reacción:

1ª PCR	Volumen (µL)
H ₂ O	33.0
PCR Buffer 10X	5.0
dNTPs	1.0
MgCl ₂	1.5
Taq polimerasa	0.5

41 µL ↓

Hebra up mutada	Hebra down mutada
41µL mezcla de reacción	41 µL mezcla de reacción
2 µL cebador Low2	2 µL cebador SP6 up
2 µL oligo Up mutado	2 µL Low mutado
5 µL DNA hebra molde	5 µL DNA hebra molde

Composición y volúmenes de la tercera reacción de PCR

Volumen de reacción: 50 μ L

No. de ciclos: 40

Mezcla de reacción:

2 ^a PCR	Volumen (μ L)
H ₂ O	26.0
PCR Buffer 10X	5.0
dNTPs	1.0
MgCl ₂	1.5
Taq polimerasa	0.5

34 μ L

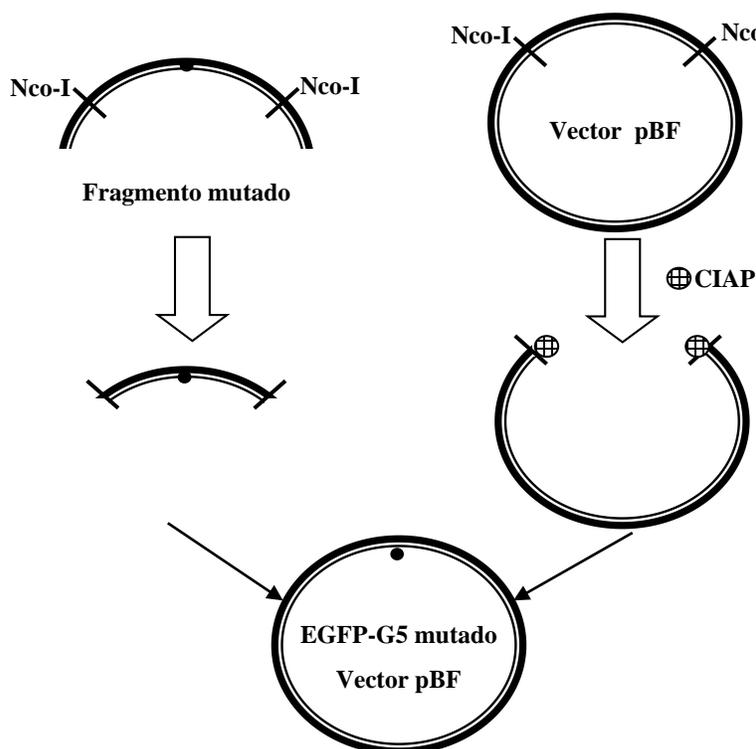
Hebra up mutada
34 μ L mezcla de reacción
2 μ L cebador SP6 up
2 μ L cebador Low2
6 μ L Hebra up mutada (1 ^a PCR)
5 μ L Hebra down mutada (2 ^a PCR)

iii. Reacción de ligación

Tabla II

Reacción de ligación de los fragmentos de PCR al vector

Reactivo	Control 1	Control 2	Ligación 1:3	Ligación 1:5
H ₂ O <small>Biología molecular</small>	✓	✓	✓	---
Buffer de ligación 10X	---	✓	✓	✓
ATP 10mM	---	✓	✓	✓
Fragmento	---		✓	✓
Vector	✓	✓	✓	✓
Ligasa	✓	✓	✓	✓

Esquema I. Clonación del fragmento mutado en el vector para ovocitos pBF

iv. Obtención de las mutaciones del canal GIRK5

La metodología que se siguió fue la misma para todas las mutantes, sin embargo se utilizaron distintos cebadores y templados (Tabla II). A continuación, se muestran los resultados representativos para la obtención de la mutante: GIRK5-YELI/AAAA. Para realizar las mutaciones se comenzó con el diseño de los oligos.

- *Diseño de oligonucleótidos*

Se buscaron sin éxito los codones preferenciales de *Xenopus* para el residuo de alanina, por lo tanto el diseño de los oligos se realizó tratando que un número mínimo de bases fuera modificado para no disminuir la complementariedad al momento de la alineación en la PCR. Para la mutante GIRK5-YELI/AAAA ya se contaba con los cebadores para poder realizar la mutagénesis de los residuos de tirosina o de leucina-isoleucina. Para mutar el residuo de ácido glutámico era necesario diseñar un cebador que mantuviera las mutaciones de Y16A, L21A e I22A. Los oligos se ordenaron a INVITROGEN Custom Primers® y tienen la siguiente secuencia:

GIRK5Y16A/E17A Up



Secuencia *Wild type*



GIRK5Y16A/E17A Low



- *Mutagénesis dirigida (recombinación por PCR)*

Una vez terminada la primera y segunda reacción de PCR se tomaron 5µL y se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El orden de las muestras y el peso esperado se muestran en la imagen iv.1. El resultado de la tercera reacción de PCR (3µL) se visualizó en un gel de agarosa al 1%, se observó la banda de peso esperado correspondiente al fragmento mutado (imagen iv.2).

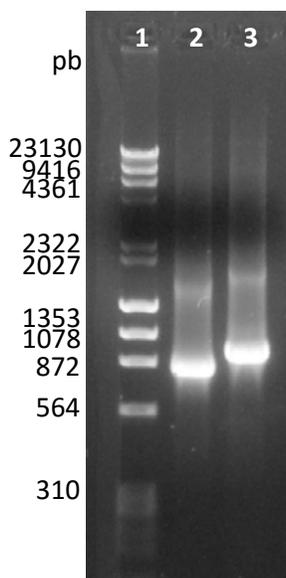


Imagen IV.1 1ª y 2ª PRC

Carril 1. Marcador
 Carril 2. Up mutado 753 pb
 Carril 3. Low mutado 956 pb

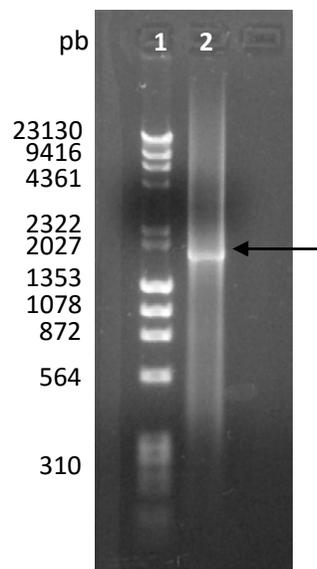


Imagen IV.2 3ª reacción de PCR

Carril 1. Marcador
 Carril 2. PCR combinatoria 1709 pb

Adicionalmente se realizaron pruebas con enzimas de digestión con el producto de la PCR combinatoria (3ª reacción de PCR). La imagen iv.3 corresponde a un gel de agarosa, donde se analizaron los productos de la PCR combinatoria.

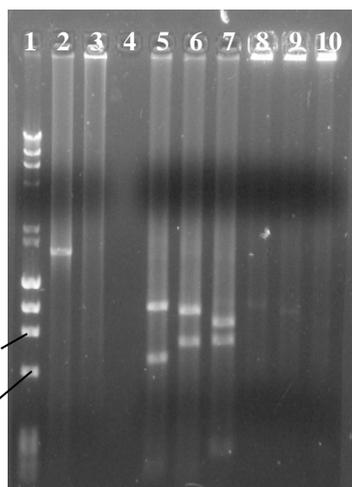


Imagen IV.3 Digestión del fragmento mutado.

- Carril 1. Marcador
- Carril 2. PCR combinatoria (1) 1709 pb
- Carril 5. Cortes con NcoI. 1013, 551, 145 pb
- Carril 6. Cortes con BamHI. 982, 647, 80 pb
- Carril 7. Cortes con XhoI. 876, 655, 178 pb

- *Ligación*

Se digirió el resto de la tercera reacción de PCR con la enzima de restricción NcoI, al igual que una muestra del vector pBF (10µg), que en este caso ya tenía subclonado la región codificante para EGFP; ambas se corrieron en un gel de agarosa al 1 %. En la imagen iv.4 se observan las bandas esperadas, éstas se purificaron del gel y se ligaron al vector pBF.

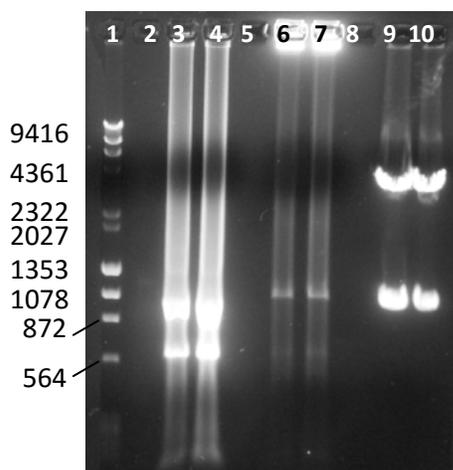


Imagen IV.4 Purificación de los fragmentos digeridos.

- Carril 1. Marcador
- Carril 3-4. EGFP-GIRK5-YELI/AAAA 1013pb
- Carril 9-10. Vector PBF 3979 pb

- *Obtención del ADN*

Con el producto de la reacción de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5-alpha. De las placas de agar se seleccionaron 9 UFC que estuvieran aisladas, se siguió el protocolo de lisis alcalina (minipreparación) y una vez obtenido el ADN se hicieron cortes con enzimas de restricción. Se seleccionaron 4 muestras de ADN de las minipreparaciones y se trataron con ARNasa. Se realizaron nuevos cortes con enzimas de restricción para comprobar el sentido de la ligación del fragmento en el vector pBF. En la imagen iv.5 se observa un ejemplo de las bandas en los pesos esperados.

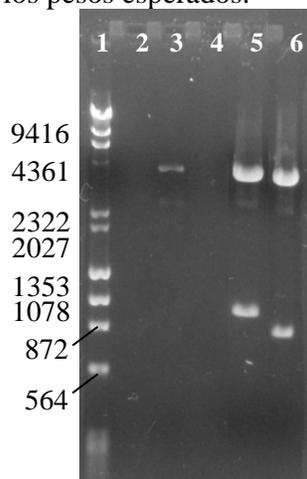


Imagen IV.5 Comprobación del sentido de la ligación

Carril 1. Marcador
 Carril 3. Vector sin fragmento 3979 pb
 Carril 5. BamHI 4010 y 982 pb
 Carril 6. HindIII 4131 y 861 pb

- *Transcripción in vitro*

Con la muestra seleccionada que dio los cortes esperados para la ligación, se realizó una midipreparación para obtener el ADN en mayor cantidad. Se realizó una digestión con una enzima de digestión para linearizar el plásmido, donde termina la región codificante para el canal, más la cola de poliA. Una vez linearizado se realizó una reacción de transcripción *in vitro* para obtener el ARNm. Finalmente se analizó por electroforesis una muestra de dicho ARNm para comprobar el peso adecuado (2348 pb), imagen iv.6.

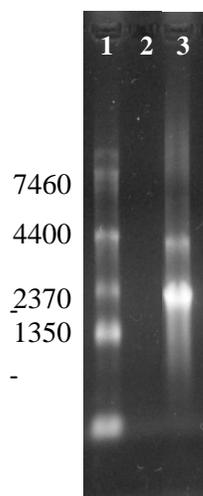


Imagen IV.6 ARNm del canal mutado

Carril 1. Marcador
 Carril 3. ARNm 2348 pb

v. Subclonación del marcador fluorescente de retículo endoplásmico

Se identificaron las endonucleasas de restricción para generar los extremos cohesivos tanto en el vector ECFP-ER (Nhe-I / Kpn I), como en el vector PBF (Xba I / Kpn I). Se hicieron las digestiones enzimáticas, se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se purificaron los fragmentos de interés y se pusieron en una reacción de ligación para subclonar el fragmento, de forma similar a la descrita anteriormente. Los extremos generados por la digestión con Nhe-I y Xba-I son extremos cohesivos; a continuación se muestra la secuencia que reconoce cada enzima para digerir el ADN, el sitio de corte y la secuencia que deja después del corte, lo que origina extremos pegajosos que pueden ligarse entre sí.



Después de la ligación se obtuvo satisfactoriamente el ADN de ECFP-ER (3778 pb), se realizaron unas digestiones enzimáticas para comprobar el sentido de la ligación del fragmento (imagen iv.7) y finalmente se linearizó para realizar una transcripción *in vitro* y obtener el ARNm (imagen iv.8).

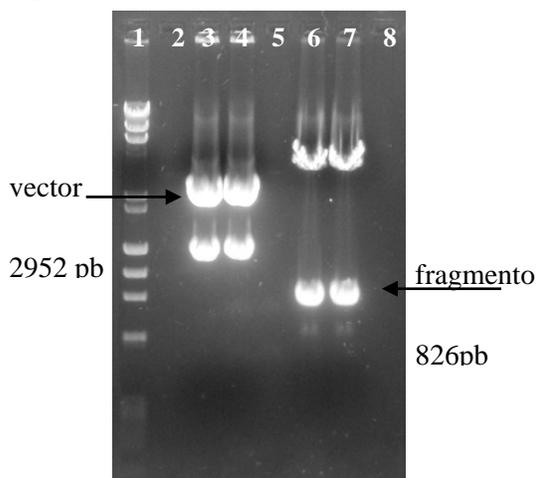


Imagen V.1 Digestiones del vector pBF y el vector pECFP-ER.

Carril 1 marcador
 Carril 2 ---
 Carril 3-4 vector pBF
 Carril 5-6 vector pECFP-ER

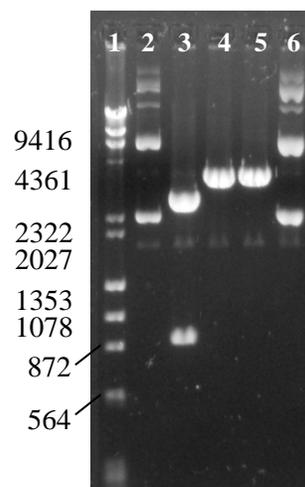
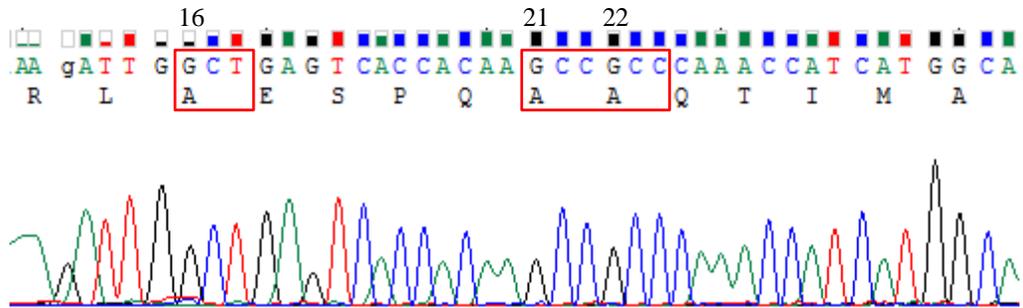


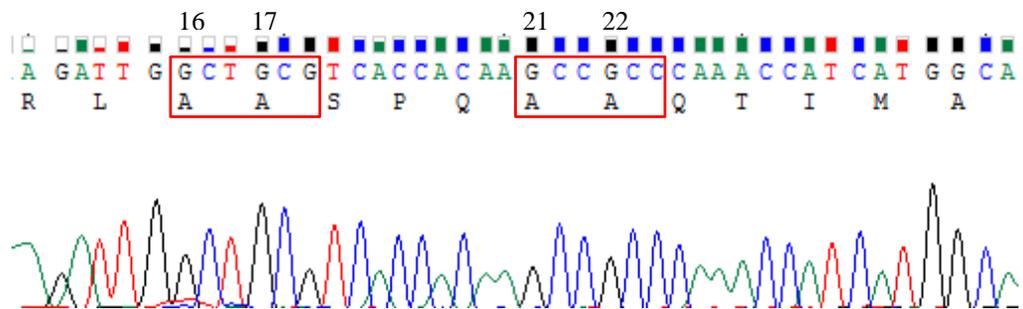
Imagen V.2 Digestiones de pECFP-ER en el vector pBF.

Carril 1 marcador
 Carril 2 ECFP-ER sin digerir
 Carril 3 HindIII
 Carril 4 EcoRI (lineariza)
 Carril 5 MluI (lineariza)
 Carril 6 NcoI (no corta)

- GIRK5-Y16AL21AI22A



- GIRK5-Y16AE17AL21AI22A



vii. Artículos publicados

- **Díaz-Bello B**, Rangel-García CI, Salvador C, Carrisoza-Gaytán R, Escobar LI. The Polarization of the G-Protein Activated Potassium Channel GIRK5 to the Vegetal Pole of *Xenopus laevis* Oocytes Is Driven by a Di-Leucine Motif. PLoS ONE. (2013). 8(5): e64096. doi:10.1371/journal.pone.0064096.
- Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, **Díaz-Bello B**, Escobar LI. Differential expression of the Kv1 voltage-gated potassium channel family in the rat nephron. J Mol Histol. (2014). 45(5):583-97. doi: 10.1007/s10735-014-9581-4.

The Polarization of the G-Protein Activated Potassium Channel GIRK5 to the Vegetal Pole of *Xenopus laevis* Oocytes Is Driven by a Di-Leucine Motif

Beatriz Díaz-Bello, Claudia I. Rangel-García, Carolina Salvador, Rolando Carrisoza-Gaytán, Laura I. Escobar*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Abstract

The G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels (known as GIRK or Kir3) form functional heterotetramers gated by G- $\beta\gamma$ subunits. GIRK channels participate in heart rate modulation and neuronal postsynaptic inhibition in mammals. In *Xenopus laevis* oocytes, GIRK5 is a functional homomultimer. Previously, we found that phosphorylation of a tyrosine (Y16) at its N-terminus downregulates the surface expression of GIRK5. In this work, we elucidated the subcellular localization and trafficking of GIRK5 in oocytes. Several EGFP-GIRK5 chimeras were produced and an ECFP construct was used to identify the endoplasmic reticulum (ER). Whereas GIRK5-WT was retained in the ER at the animal pole, the phospho-null GIRK5-Y16A was localized to the vegetal pole. Interestingly, a construct with an N-terminal $\Delta 25$ deletion produced an even distribution of the channel in the whole oocyte. Through an alanine-scan, we identified an acidic cluster/di-leucine sorting-signal recognition motif between E17 and I22. We quantified the effect of each amino acid residue within this di-leucine motif in determining the distribution of GIRK5 to the animal and vegetal poles. We found that Y16 and I22 contributed to functional expression and were dominant in the polarization of GIRK5. We thus conclude that the N-terminal acidic di-leucine motif of GIRK5 determines its retention and polarized trafficking within XI oocytes.

Citation: Díaz-Bello B, Rangel-García CI, Salvador C, Carrisoza-Gaytán R, Escobar LI (2013) The Polarization of the G-Protein Activated Potassium Channel GIRK5 to the Vegetal Pole of *Xenopus laevis* Oocytes Is Driven by a Di-Leucine Motif. PLoS ONE 8(5): e64096. doi:10.1371/journal.pone.0064096

Editor: Zhe Zhang, Virginia Commonwealth University, United States of America

Received: February 5, 2013; **Accepted:** April 7, 2013; **Published:** May 22, 2013

Copyright: © 2013 Díaz-Bello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Dirección General de Estudios de Posgrado (DGAPA) Grants IN224406 and IN202110 at the Universidad Nacional Autónoma de México. CONACYT Grant 166913. Beatriz Díaz-Bello (PhD) and Claudia Rangel (MSc) were supported by a fellowship from CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurae@unam.mx

Introduction

Xenopus laevis (XI) oocytes are the best characterized model for maturation and fertilization. Like other oocytes, XI oocytes are asymmetric cells with a complex internal polarity. On one side, the dark animal pole contains the nucleus, the endoplasmic reticulum (ER) and pigmented granules [1]; on the other side, the germ plasma and a mitochondrial cloud are distributed evenly in the cytoplasm towards the yellow pale vegetal pole [2,3]. In oocytes, the asymmetry of mRNAs contributes to the maintenance and organization of the cytoskeleton network in the vegetal cortex [4,5]. Despite the well characterized asymmetry of mRNAs and subcellular organelles in oocytes, little is known about the polarization of their maternal proteins.

G-protein regulated inward-rectifier potassium channels (GIRK) are a subfamily of proteins that participate in signaling responses at inhibitory synapses in mammals [6,7]. Up to now, four members of this family, known as GIRK1-4 or Kir3.1-3.4, have been identified in mammals. These channels are either homotetramers (GIRK2) or heterotetramers of GIRK1 that are activated by G- $\beta\gamma$ subunits. They are present in non-excitable cells such as platelets [8], lung cancer [9] and breast cancer [10,11]. Another member of this family is GIRK5, an endogenous G-protein activated potassium channel present only in XI oocytes

[12]. GIRK5 is a homotetramer that helps to maintain a hyperpolarized resting membrane potential; GIRK5 shows a basal activity due to an endogenous G- $\beta\gamma$ protein pool that keeps oocytes meiosis arrest [13–16]. Interestingly, in contrast to its mammalian homologues, GIRK5 contains a particularly long N-terminus (Fig. 1).

Previously, we found that within this N-terminus, the dephosphorylation of Y16 determines whether GIRK5 is transported to the plasma membrane [15]. Since GIRK5 surface expression occurred only one hour after incubation with a Protein Tyrosine Kinase inhibitor, we hypothesized then that GIRK5 was retained in a subcellular compartment. In this report, we have determined the subcellular localization of GIRK5. We discovered that it is polarized to the vegetal pole, and that such polarization is dependent on a di-leucine motif (YEXXXLI) at its N-terminus. There is precedence of di-leucine motifs in contributing to the polarization of proteins. For example, several proteins are targeted to dendrites in neurons and basolateral membranes in epithelial cells in a di-leucine dependent manner [17–22], and several proteins depend on such motifs for trafficking at the level of the trans-Golgi network, endosomes, plasma membrane, and lysosomes [23]. However, this is the first study in which the role of di-leucine motifs in polarizing maternal ion channels like GIRK5 is investigated. Our study represents an important step forward in

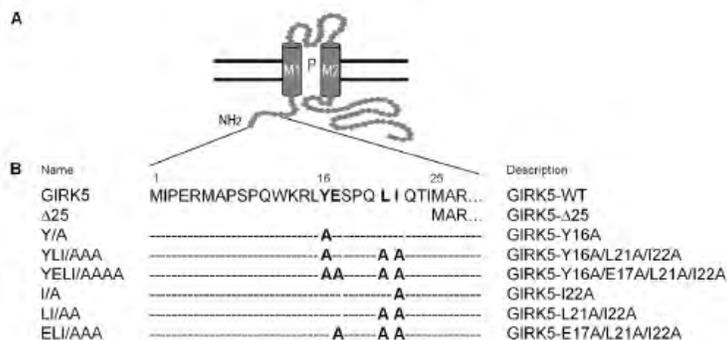


Figure 1. Cytoplasmic N-terminal domain of a GIRK5 subunit and constructs generated. A) GIRK5 is composed of a short intracellular N-terminus, two trans-membrane helices (M1 and M2), a pore (P), an extracellular loop, and a long unstructured C-terminus (Bichet D., 2003 and Choe S., 2002). The N-terminus of GIRK5 contains an acidic di-leucine motif (16-YEXXXL-22) that drives its cellular trafficking. B) Name and description of each mutant used in this study.
doi:10.1371/journal.pone.0064096.g001

Table 1. Primers used for site-specific mutagenesis.

Construct generated	Primer sequence
SP6	5' - GATT TAGGTGACACTATAGAA - 3'
Low 2	5' - AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTCGCC TGT ATC AAA - 3'
GIRK5-Y16A	5' - AAAGATTGGCTGAGTCACC - 3' (sense) 5' - GGTGACTCAGCCAATCTTT - 3' (anti-sense)
GIRK5-E17A	5' - GATTGATGCGTCACCAC - 3' (sense) 5' - GTGGTGACGCATACAATC - 3' (anti-sense)
GIRK5-S18A	5' - TTGTATGAGGCGCCACAACCTC - 3' (sense) 5' - GAGTTGTGGCGCCTCATAACA - 3' (anti-sense)
GIRK5-P19A	5' - GATTGAGTCAGCACAACTCATC - 3' (sense) 5' - GATGAGTTGTGCTGACTCATAC - 3' (anti-sense)
GIRK5-Q20A	5' - GAGTCACCAGCGCTGATCCAA - 3' (sense) 5' - TTGGATGAGCGCTGGTGACTC - 3' (anti-sense)
GIRK5-L21A	5' - CACCACAAGCCATCCAACC - 3' (sense) 5' - GGTTGGATGGCTTGTGGTG - 3' (anti-sense)
GIRK5-I22A	5' - CCACAACCTCGCCCAAACCATC - 3' (sense) 5' - GATGGTTGGCGGAGTTGTGG - 3' (anti-sense)
GIRK5-LI/AA	5' - GAGTCACCACAAGCGCCCAAACCATCATCGC - 3' (sense) 5' - GCCATGATGGTTTGGCGGCTTGTGGTACTC - 3' (anti-sense)
GIRK5-ELI/AAA	5' - GATTGATGCGTCACCAC - 3' (sense) 5' - GTGGTGACGCATACAATC - 3' (anti-sense)
(GIRK5-LI/AA as template)	5' - AAAGATTG GCT GAGTCACC - 3' (sense)
(GIRK5-I/A as template)	5' - GGTGACTCA GCC AATCTTT - 3' (anti-sense)
(GIRK5-YLI/AAA as template)	5' - GAGTCACCACAAGCGCCCAAACCATCATGGC - 3' (sense)
(GIRK5-Y/A as template)	5' - GCCATGATGGTTTGGCGGCTTGTGGTACTC - 3' (anti-sense)
(GIRK5-YELI/AAAA as template)	5' - AAGATTGGCTGCGTCACC - 3' (sense)
(GIRK5-LI/AA as template)	5' - GGTGACGCAGCCAATCTT - 3' (anti-sense)

doi:10.1371/journal.pone.0064096.t001

understanding how the localization of maternal ion channels is carefully controlled in *Xl* oocytes.

Materials and Methods

DNA Constructs

Site-specific mutagenesis of Y16A, E17A, S18A, P19A, Q20A, L21A and I22A was performed by PCR, using GIRK5 cDNA (GenBank ID: AAB53154.1) as template and the primers listed in Table 1. In all cases, SP6 (sense) and Low 2 (anti-sense) were used

as flanking primers. Constructs encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion proteins were generated by adding the Open Reading Frame (ORF) of pEGFP-C1 (Clontech) to the N-terminus of GIRK5 cDNA. All GIRK5 cDNAs and EGFP chimera constructs were subcloned into the pRSSP6013A3-UWE vector (pBF) and sequenced. The ORF of the ER marker, pECFP-ER (BD Living Colors, Clontech), was subcloned into the pRSSP6013A3-UWE vector (pBF) and sequenced. A summary of all the constructs used in this study is shown in Table 1.

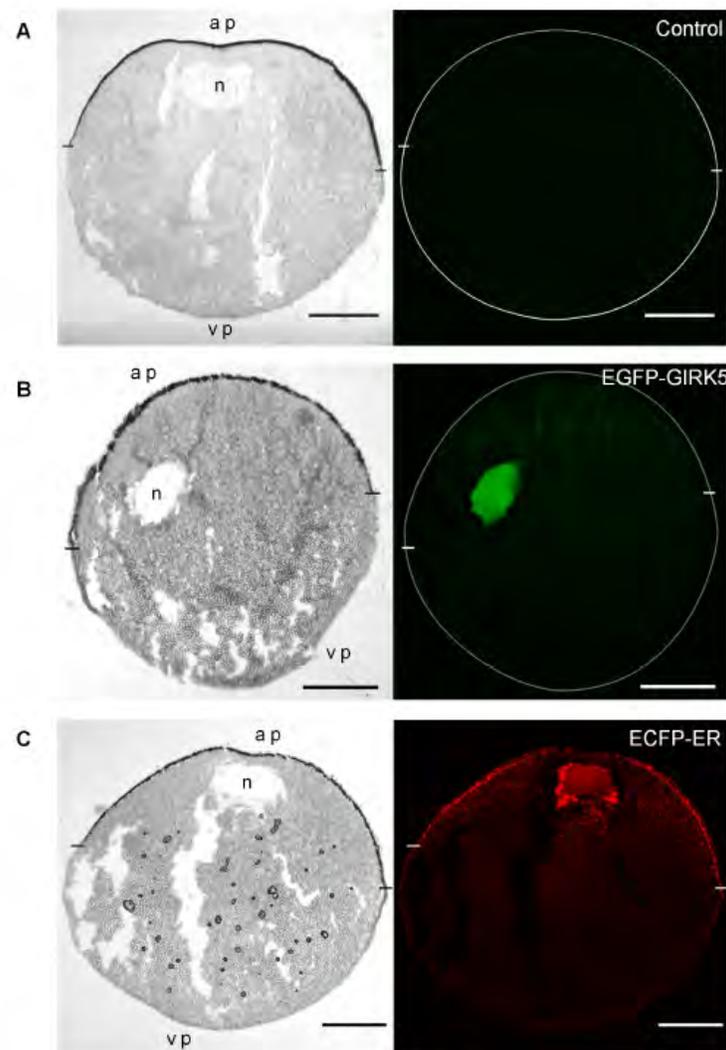


Figure 2. Localization of GIRK5 in an *Xl* oocyte. Images on the left and right show light transmission and confocal images, respectively. The animal pole (ap) and vegetal pole (vp) are shown at the top and the bottom of each panel, respectively. Oocyte circumference (A and B) and the limits between the animal and vegetal poles are indicated on confocal images with a white circle and dashes, respectively. The nucleus (n) is shown on the light transmission images. A) Non injected; B) Injected with EGFP-GIRK5, which localized in the nucleus at the animal pole (green); C) Injected with ECFP-ER, which labeled the ER (red). Scale bar: 250 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0064096.g002

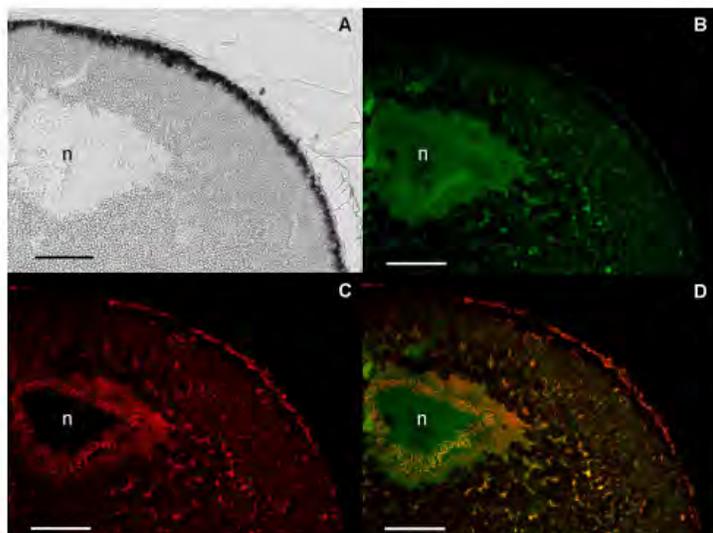


Figure 3. Polarization of GIRK5 within the animal pole. A) Light transmission image of the oocyte animal pole section; B,C,D) Confocal microscopic image of the same animal pole section visualizing EGFP-GIRK5 (B, green), ECFP-ER (C, red) or both (D). GIRK5 localized both in the nucleus (n, green) and the ER (yellow). A 40 \times objective was used. Scale bar: 100 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0064096.g003

mRNA Synthesis and Microinjection

GIRK5, GIRK5 mutants, EGFP chimera and ECFP-ER mRNAs were synthesized from linearized plasmid vectors using the mMessage mMachine kit (Ambion Corporation). For microinjection, we used full-grown (stage VI) *Xl* oocytes, the needle was inserted in the vegetal hemisphere close to the equator, at an approximately 45-degree angle. Frogs were anesthetized and oocytes were obtained as described in [14]. Each oocyte was injected with 20 ng (50 nL) of mRNA. Control oocytes were injected with water. Oocytes were maintained in a ND96 solution (NaCl 96 mM, KCl₂ mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, sodium pyruvate 2.5 mM; pH 7.4) at 18°C.

Confocal Microscopy

Four days after mRNA injection oocytes were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA; Sigma) in ND96 (to avoid nucleus deformation) for 10 minutes. Oocytes were incubated in 30% sucrose, 2% PFA, ND96 and kept at 4°C. Serial 10 μ m slices were cryostat-cut (Leica CMI100) at -20°C, mounted on gelatin-coated slides, and cover-slipped with Vectashield mounting medium (Vector laboratories, CA, USA). EGFP and ECFP fluorescence was excited with an argon laser beam at 488 and 458 nm, respectively. A Leica TCSPS5 microscope was used. EGFP and ECFP emitted fluorescent light was collected between 500 and 544 nm, and between 473 nm and 524 nm, respectively. ECFP fluorescence was collected in blue and changed to red to facilitate the merge. To avoid crosstalk between the two channels, double-labeled images were acquired subsequently and emission was collected between 496–530 nm for EGFP and between 460–495 nm for ECFP. Images were taken using a 10 \times and 40 \times dry lens at the mid-section of each oocyte. The pixel density was 4.36×10^3 pix/mm² with a resolution of 1024 \times 1024 pixels. Quantification of fluorescence was estimated with the Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite 2.6.0 software.

Comparison of the ion channel distribution between the animal and the vegetal pole were performed from independent regions-of-interest (ROI). The relative intracellular fluorescence was given as the ratio between one ROI and the whole-cell fluorescence intensity. Non-injected oocytes were used as a control of autofluorescence; the fluorescence below 50 gray values (autofluorescence) was subtracted from the injected oocytes.

Western Blotting

The total membrane fraction was obtained by homogenization using 2 μ l of lysis buffer (sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, TRIS 1 mM, protease inhibitor mini Complete from Roche; pH 7.6) per oocyte, followed by two rounds of centrifugation at 200 g for 10 min at 4°C. The supernatant was mixed with 2 μ l of Laemmli buffer per oocyte, heated to 95°C following the procedure described before [15].

Electrophysiology

Whole-cell currents were recorded two to four days after mRNA injection with a two-electrode voltage clamp amplifier (Geneclamp 500) and a Digidata 1322A interface with pClamp8 software (Axon Instruments) at room temperature (22–24°C), as described previously [15]. The recording solution contained: 118 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.4. The recording pipette was filled with 3 M KCl. Voltage pulse protocols were performed using consecutive 100 ms step changes from -160 to +60 mV with increments of 20 mV. Oocytes were clamped at a holding potential of 0 mV. Data were sampled at 5–10 kHz and filtered at 1–5 kHz. Error bars correspond to the mean \pm SEM from a number (n) of independent experimental observations. ANOVA and student t-tests were used to test statistical significance ($p < 0.05$).

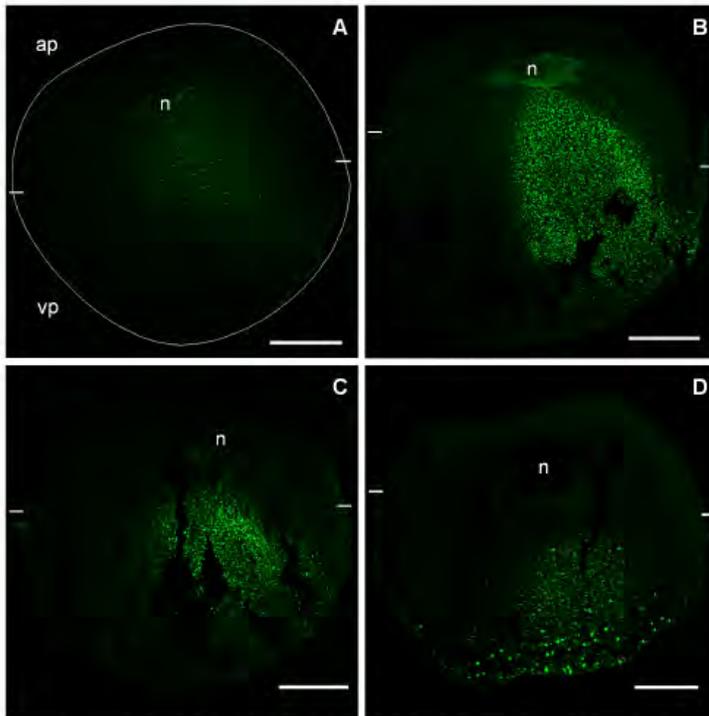


Figure 4. Time-course of GIRK5-Y/A expression. The expression of the EGFP-Y/A construct was observed at different time points after mRNA injection: A) 24 h, a faint expression of Y/A was observed; B) 48 h, Y/A was localized next to the nucleus and in the cytoplasm; C) 72 h, Y/A was in the cytoplasm towards the vegetal pole; D) 96 h, Y/A was in the vegetal pole. The animal pole (ap) and vegetal pole (vp) are shown at the top and the bottom of each panel, respectively. The oocyte circumference is indicated with a white circle in panel A. The limits between the animal and vegetal poles are indicated with white dashes. Scale bar: 250 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0064096.g004

Results

GIRK5 Localizes to the Nucleus and the Endoplasmic Reticulum within the Animal Pole of *Xl* Oocytes

In order to determine the localization of GIRK5 in *Xl* oocytes, we initially used confocal microscopy to follow two constructs: an endoplasmic reticulum (ER)-enhanced cyan fluorescent protein marker (ECFP-ER) and EGFP-GIRK5. ECFP-ER was observed from the nuclear membrane throughout the cytoplasm, mostly within the animal pole (Figs. 2C and 3C), up to the plasma membrane, accordingly to previous studies of ER distribution in immature oocytes [24]. The EGFP-GIRK5 construct was also localized in the perinuclear space and the ER within the animal pole, but additionally, it was detected in the nucleus (Figs. 2B and 3B). This was more clearly seen after the co-injection of EGFP-GIRK5 and ECFP-ER mRNAs, where the perinuclear space and ER appeared yellow from the co-localization of both markers, but the nucleus appeared green from the sole presence of EGFP-GIRK5 (Fig. 3D).

The Asymmetric Localization of the phospho-null GIRK5 is Dictated by its N-terminus

Since we previously determined that Y16 is a key residue that determines if GIRK5 is transported to the plasma membrane [15],

we investigated how the localization of the phospho-null GIRK5 (EGFP-Y/A) changed over the course of six days. The first day after injection, a faint expression was observed across the animal pole (Fig. 4A). The second and third day, the channel was in the cytoplasm across both poles (Fig. 4 B–C). The fourth day, EGFP-Y/A appeared to have migrated to the vegetal pole displaying a clear punctuate distribution (Fig. 4D). This last localization was maintained until the sixth day (data not shown).

Next, we performed a more quantitative comparison of the distribution pattern of the three EGFP-constructs (GIRK5, Δ 25 and Y/A) by averaging the ROI of the animal versus the vegetal pole (Fig. 5B). Clearly the three constructs showed distinct distributions, with GIRK5 mostly localized at the animal pole, Δ 25 equally dispersed in the whole oocyte, and Y/A localized at the vegetal pole (Fig. 5A, B). These results confirm the existence of a polarization-sorting motif located within the N-terminus of GIRK5.

An Acidic Di-leucine Motif is the Sorting Signal

Interestingly, the ESPQLI sequence upstream of Y16 corresponds to an acidic [DE]XXXL[LI] di-leucine motif (Fig. 1) [23]. Therefore, we hypothesized that it could be involved in determining how GIRK5 is trafficked. To test this, we first substituted the key residues within this sequence of the phospho-

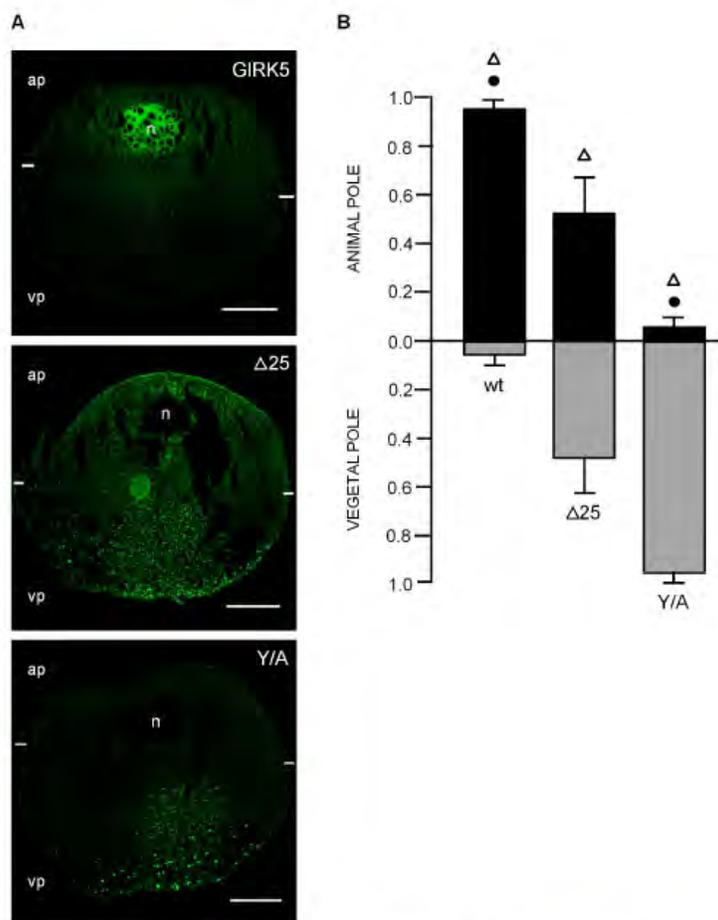


Figure 5. Localization of GIRK5-WT, GIRK5-Δ25 and GIRK5-Y/A. A) Confocal microscopy images of EGFP chimeras of GIRK5, GIRK5-Δ25 and GIRK5-Y/A. B) Fluorescence quantification. GIRK5 was localized at the animal pole ($P < 0.001$); GIRK5-Δ25 showed an even distribution in the whole oocyte ($P > 0.001$); GIRK5-Y/A localized to the vegetal pole ($P < 0.001$). Scale bar: 250 μ m. Error bars correspond to mean \pm SD; n = 4–6. Circle indicates significant differences of the animal pole compared to vegetal pole ($P < 0.001$; paired Student's t test). Triangle indicates that there is a significant difference among them ($P < 0.005$; One Way – ANOVA). Auto-fluorescence of water-injected oocytes (control) was subtracted from mutants. doi:10.1371/journal.pone.0064096.g005

null EGFP-Y/A to an alanine (Fig. 6A). Quantitative comparison among the different EGFP chimeras showed that the triple mutant YLI/AAA was not polarized (Fig. 6B), but disruption of the acidic motif EXXXLI, corresponding to YELI/AAAA, promoted expression predominantly to the plasma membrane of the animal pole (Fig. 6B). These data thus confirm that the acidic di-leucine motif is important in GIRK5 localization. Immunoblotting of the EGFP-GIRK5 constructs confirmed their expression and the expected size of 75 kDa (Fig. 6C).

Y16 and I22 have a Dominant Effect in the YESPQLI Sequence

Having determined the 16-YESPQLI-22 sequence as the sorting signal motif, and due to the high electrical activity of ion channels, we proceeded to evaluate the functional expression of the channel mutants. We mutated each one of the amino acid

residues to an alanine residue to determine their individual role in GIRK5 activity (Fig. 7A). GIRK5, GIRK5-E17A, GIRK5-S18A, GIRK5-P19A, GIRK5-Q20A and GIRK5-L21A were not functional. However, GIRK5-I22A was functional even when Y16 was not replaced by an alanine residue. Electrical activity was additive only for some mutants: I/A = LI/AA = ELI/AAA < YI/AA < YLI/AAA = Δ25 = Y16A < YELI/AAAA (Fig. 7A) and disruption of the whole acidic di-leucine motif in the phospho-null channel promoted the highest activity (Fig. 7A, B).

I22 Contributes to GIRK5 Intracellular Retention and the Acidic Residue E20 to the Asymmetric Trafficking

Since I22A was functional even when Y16 was present, we proceeded to analyze the localization of the I/A, LI/AA and ELI/AAA EGFP-constructs. I/A and LI/AA lost ER retention and traveled to the vegetal hemisphere; in contrast, ELI/AAA was

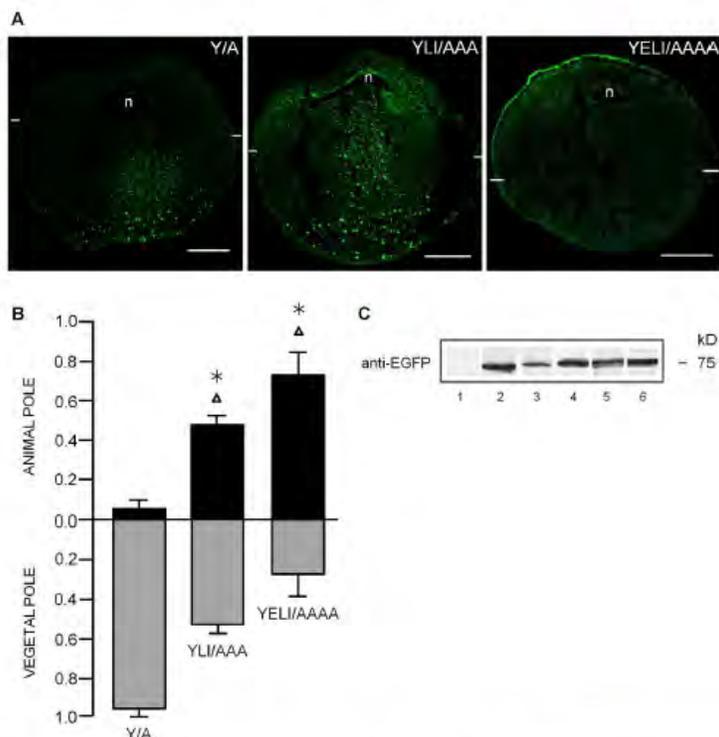


Figure 6. Role of the di-leucine motif in the localization of GIRK5. A) Confocal microscopy images of EGFP chimeras. Removal of the hydrophobic leucine and isoleucine residues in the nonphosphorylated GIRK5 (YLI/AAA), targeted the channel equally to both poles. Remarkably, alanine mutation of the whole di-leucine sorting signal (YELI/AAAA) produced GIRK5 polarization to the animal pole. Scale bar: 250 μ m. B) Fluorescence quantification. Error bars correspond to mean \pm SD, n=4–6. Triangle indicates significant differences of oocytes compared to Y16A ($P < 0.001$; One-Way ANOVA). Asterisk indicates significant differences of oocytes compared between them ($P > 0.001$; One-Way ANOVA). The statistic significance between samples is the same for the animal and vegetal pole. C) Immunoblot analysis revealed bands that correspond to the expected weight of 75 kDa of the EGFP-GIRK5 constructs: 1) Non-injected, 2) GIRK5- Δ 25, 3) GIRK5-WT, 4) GIRK5-Y/A, 5) GIRK5-YLI/AAA and 6) GIRK5-YELI/AAAA. doi:10.1371/journal.pone.0064096.g006

distributed across the oocyte as GIRK5- Δ 25 (Fig. 8A, B). Therefore, the hydrophobic I22 contributes mostly to GIRK5 intracellular retention whereas glutamate E20 to the asymmetric trafficking.

Discussion

Xl oocytes are fascinating large cells that have been a good model to understand the cell cycle and are the most widely used heterologous expression system. Despite extensive work on *Xl* oocytes, the subcellular distribution of endogenous ion channels remained unknown. In this work, we showed that the important ion channel GIRK5 was retained in the nucleus and the ER at the animal pole (Fig. 3). The asymmetric distribution of GIRK5 might have important repercussions to oocyte development.

During oogenesis, oocyte development has been shown to be greatly affected by asymmetric distribution of mRNAs [3]. For example, some important cytosolic proteins localize to the vegetal cortex. Case in point is the homologue of disheveled (*Xdsh*), which required for Wnt signaling during the secondary oocyte axis formation [25,26]; other cases include the proteins *X-Stau1* and *X-Stau2*, which are involved in targeting and anchoring of

maternal mRNAs, critical for cell fate determination, to the vegetal cortex of the oocyte [27]; and *Fatvg*, which participate in cortical rotation and the establishment of the dorsal-ventral body axis in embryos [28]. In the case of GIRK5, it is still unknown what role it plays in oocyte development. Activity of GIRK5 depends of G β γ dimers. The endogenous pool of these protein dimers maintained oocytes arrested in prophase of meiosis I and sequestration of G- β γ promotes the germinal vesicle breakdown (GVBD) [29]. We thus hypothesize that GIRK5 functional expression would favor this sequestration and therefore, the GVBD.

Asymmetry has been electrically recorded only for a few ion channels. The endogenous nicotinic acetylcholine receptor channel predominates in the vegetal pole [30]; in contrast, calcium-dependent chloride channels [31] and exogenously expressed GABA receptors and sodium-voltage gated channels [32] are more abundant in the animal pole. With respect to the spatial distribution of ion transporters, the endogenous Na⁺/K⁺ ATPase has been found in the animal pole [33].

We showed that the distribution of GIRK5 is greatly controlled by phosphorylation at residue Y16. Indeed, a variant of GIRK5 with an N-terminal deletion (Δ 25) or bearing a mutation at residue

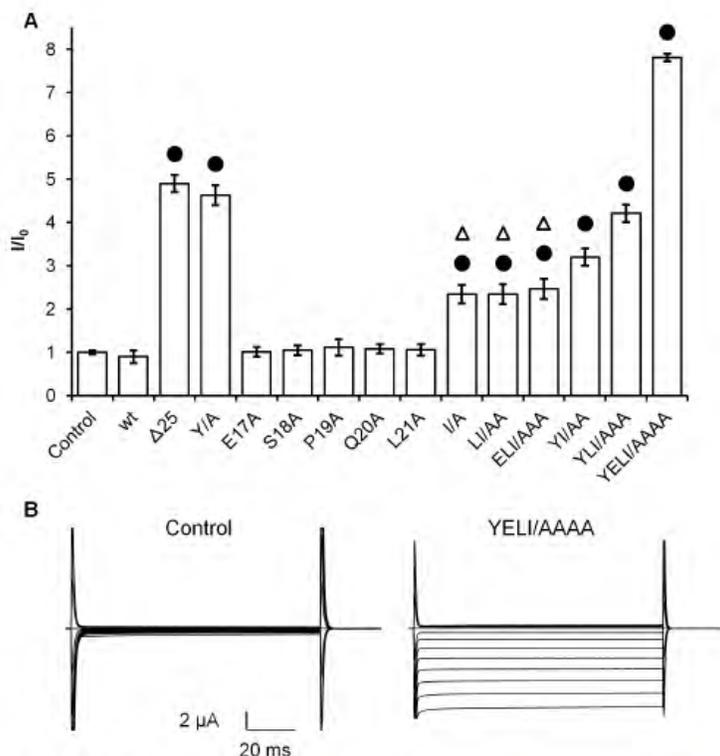


Figure 7. Activity of GIRK5 mutants. A) Normalized currents (I/I_0) registered at -160 mV in oocytes injected with H_2O (control), and mRNA of GIRK5 constructs. Error bars correspond to mean \pm SEM from a number ($n=10$) of independent experimental observations. A circle indicates a significant difference compared to the control oocytes ($P<0.01$; Student's t test). A triangle indicates no significant difference between oocytes ($P>0.01$; One-Way ANOVA). Normalized currents were registered at -160 mV, ($P<0.01$ for all bars); B) A representative trace recording with control and GIRK5-YELI/AAAA is shown. GIRK5-YELI/AAAA elicited longer potassium inward currents ($8.2\pm 0.06 \mu A$). Steps of 100 ms from -160 to $+60$ mV with increments of 20 mV were applied. Oocytes were clamped at a holding potential of 0 mV and registered in a highly concentrated K^+ solution (118 mM).
doi:10.1371/journal.pone.0064096.g007

Y16 (Y/A) showed completely different distributions. The former localized across the entire oocyte, whereas the latter showed mostly at the animal pole (Fig. 5). This implicated that there were more residues at the N-terminus involved in the localization of GIRK5. As we demonstrated later, the acidic di-leucine motif adjacent to Y16 (sequence ESPQLI) also has an important role in GIRK5 distribution.

Di-leucine motifs are defined as [DE]XXXL[L]I. Besides the obvious importance of the Leu residues, it is known that the nature and position of the XXX residues within the motif are important [17,34]. For example, the glucose transporters GLUT8 and GLUT12 both have a di-leucine motif but with different sequences. GLUT8 has a XXP sequence that directs it to lysosomes. It is then not surprising that GIRK5, which has an XPX sequence, shares the same fate as GLUT12 and it is directed to the plasma membrane. Other examples of membrane proteins that rely on di-leucine motifs for trafficking include NPP1, an enzyme of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family [35], the chlorine channel CIC-2 [36], and rat GIRK2, which besides the di-leucine motif it contains a close phosphorylatable Ser residue that functions as a switch that regulates its surface expression [37].

Similar to rat GIRK2, the localization and localization of GIRK5 depends both on its phosphorylatable Y16 and the key di-leucine residue I22. This was demonstrated not only by different distributions of Y/A and I/A variants, but also by measuring their electrical activity (Fig. 7), which suggested that residues near or in the acidic di-leucine motif contribute to the proper recognition of the N-terminus for ER retention. This is somewhat surprising as usually di-leucine motifs are forward ER trafficking signals of G-protein coupled receptors [38–44]. However, the di-leucine motif of the synaptic adhesion-like molecule 1 (SALM1) also functions as ER retention signal [45]. It will be interesting to see if future studies reveal the mechanisms dictating such distinct ER trafficking responses to di-leucine motifs.

In conclusion, GIRK5 is polarized to the vegetal pole of *Xl* oocytes thanks to its phosphorylatable Y16 residue and its adjacent acidic di-leucine motif. These findings represent an important stepping stone in understanding how ion channels are transported in the maturation and fertilization model of *Xl* oocytes. We intend to carry out similar experiments of other membrane proteins of this important cellular system in the future.

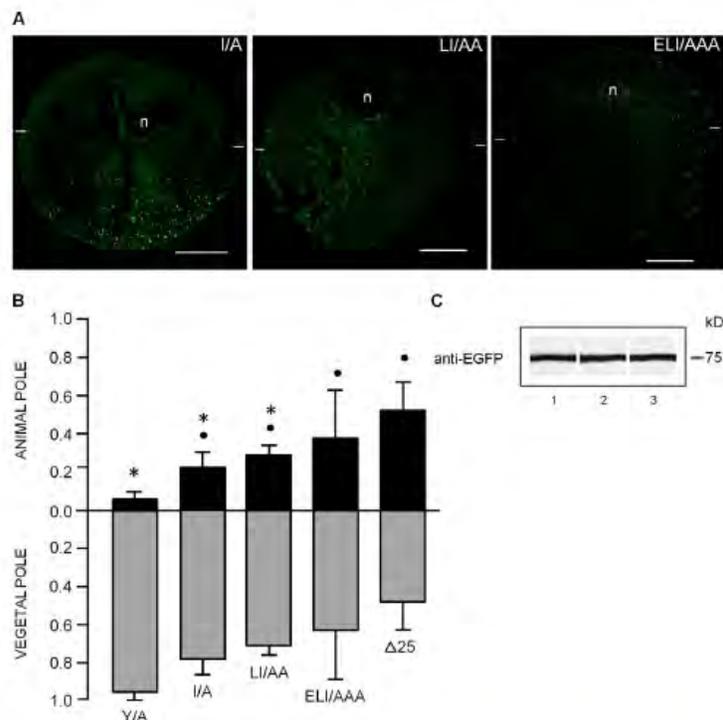


Figure 8. Retention and polarization of GIRK5 mutants bearing the I/A mutation. A) Confocal microscopy assays and B) Quantification of fluorescence show that removal I22 residue in GIRK5, as shown in L1/AA and L1/AA, causes loss of polarization, whereas the EL1/AAA variant is targeted to both poles like Δ25. Scale bar: 250 μm. Error bars correspond to mean ± SD, n = 4–6. A circle and an asterisk indicate significant differences compared to oocytes expressing Y/A and Δ25, respectively ($P < 0.05$; One-Way ANOVA). The statistic significance between samples is the same for the animal and vegetal pole. C) Immunoblot analysis of EGFP-GIRK5 mutants with bands corresponding to the expected weight of 75 kDa: 1) L1/AA, 2) L1/AA, 3) EL1/AAA.

doi:10.1371/journal.pone.0064096.g008

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Luis Vaca for the ECFP-ER cDNA, Dr. Ivonne Mora for her technical assistance; María José Gomora for assistance with the confocal microscope (Grant SDI-PTID.05.01); Dr. Ernesto Maldonado and Dr. Alejandro Zentella for their valuable comments; Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM; Eric Escobar for his assistance in edition.

References

- Merriam RW, Sauterer RA, Christensen K (1983) A subcortical, pigment-containing structure in *Xenopus* eggs with contractile properties. *Dev Biol* 95: 439–446.
- Kloc M, Bilinski S, Chan AP, Etkin LD (2001) Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation* 67: 80–83.
- King ML, Messitt TJ, Mowry KL (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell* 97: 19–33.
- Kloc M, Etkin LD (2005) RNA localization mechanisms in oocytes. *J Cell Sci* 118: 269–282.
- Kloc M, Chan AP (2007) Centroid, a novel putative DEAD-box RNA helicase maternal mRNA, is localized in the mitochondrial cloud in *Xenopus laevis* oocytes. *Int J Dev Biol* 51: 701–706.
- Dascal N (1997) Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* 9: 551–573.
- Yamada M, Iranobe A, Kurachi Y (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 50: 723–760.
- Shankar H, Murugappan S, Kim S, Jin J, Ding Z, et al. (2004) Role of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in P2Y12 receptor-mediated platelet functional responses. *Blood* 104: 1335–1343.
- Plummer HK, Dhar MS, Cekanova M, Schuller HM (2005) Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC Cancer* 5: 104.
- Dhar MS, Plummer HK (2006) Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channel (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiol* 6: 8.
- Wagner V, Stadelmeyer E, Riederer M, Reginig P, Goischeck A, et al. (2010) Cloning and characterisation of GIRK1 variants resulting from alternative RNA editing of the KCNJ3 gene transcript in a human breast cancer cell line. *J Cell Biochem* 110: 598–608. A.
- Hedin K, Lam N, Clapham D (1996) Cloning of a *Xenopus laevis* Inwardly Rectifying K Channel Subunit That Permits GIRK1 Expression of I_h Currents in Oocytes. *Neuron* 16: 423–429. A.
- Salvador C, Martínez M, Mora SI, Egidio W, Fariás JM, et al. (2001) Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim Biophys Acta* 1512: 135–147.
- Bauer GK, Falk T, Schwarz JR (1996) An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch* 432: 812–820.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LIE BDB. Performed the experiments: BDB CIR-G CS RCG. Analyzed the data: BDB CIR-G RCG. Contributed reagents/materials/analysis tools: LIE. Wrote the paper: LIE BDB.

15. Mora SI, Escobar LI (2005) Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homooligomers. *FEBS Lett* 579: 3019–3023.
16. Sheng Y, Tiberi M, Booth R a, Ma C, Liu XJ (2001) Regulation of Xenopus oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr Biol* 11: 405–416.
17. Hunziker W, Fumey C (1994) A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* 13: 2963–2969.
18. Newton EE, Wu Z, Simister NE (2005) Characterization of basolateral-targeting signals in the neonatal Fc receptor. *J Cell Sci* 118: 2461–2469.
19. Miranda KC, Khromykh T, Christy P, Le TL, Gottardi CJ, et al. (2001) A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 22565–22572.
20. El Nemer W, Golin Y, Bauby C, Codogno P, Fraser RH, et al. (1999) Isoforms of the Latheran/basal cell adhesion molecule glycoprotein are differentially delivered in polarized epithelial cells. Mapping of the basolateral sorting signal to a cytoplasmic di-leucine motif. *J Biol Chem* 274: 31903–31908.
21. Xu J, Zhu Y, Heinemann SF (2006) Identification of sequence motifs that target neuronal nicotinic receptors to dendrites and axons. *J Neurosci* 26: 9780–9793.
22. Rai T, Sasaki S, Uchida S (2006) Polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an NH2-terminal sorting signal. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C298–304.
23. Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395–447.
24. Terasaki M, Ruffin LL, Hand A R (2001) Changes in organization of the endoplasmic reticulum during Xenopus oocyte maturation and activation. *Molecular biology of the cell* 12: 1103–1116.
25. Sokol SY, Klingensmith J, Perrimon N, Itoh K (1995) Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed Xenopus homolog of dishevelled. *Development* 121: 3487.
26. Miller JR, Rowning BA, Larabell CA, Yang-Snyder JA, Bates RL, et al. (1999) Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* 146: 427–437.
27. Allison R, Czaplinski K, Git A, Adeghenro E, Stennard F, et al. (2004) Two distinct Staufin isoforms in Xenopus are vegetally localized during oogenesis. *RNA* 10: 1751–1763.
28. Chan AP, Kloc M, Larabell CA, LeGros M, Ekin LD (2007) The maternally localized RNA fatvg is required for cortical rotation and germ cell formation. *Mech Dev* 124: 350–363.
29. Lutz JB, Kim B, Jahani D, Hammes SR (2000) G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in Xenopus laevis oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 275: 41512–41520.
30. Barnard EA, Mileti R, Sumikawa K (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in Xenopus oocytes. *Pro R Soc Lond B Biol Sci* 215: 241–246.
31. Machaca K, Hartzell HC (1998) Asymmetrical distribution of Ca-activated Cl channels in Xenopus oocytes. *Biophys J* 74: 1286–1295.
32. Peter AB, Schittny JC, Niggli V, Reuter H, Sigel E (1991) The polarized distribution of poly(A⁺)-mRNA-induced functional ion channels in the Xenopus oocyte plasma membrane is prevented by anticytoskeletal drugs. *J Cell Biol* 114: 455–464.
33. Mohanty BK, Gupta BL (2012) A marked animal-vegetal polarity in the localization of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity and its down-regulation following progesterone-induced maturation. *Mol Reprod Dev* 79: 138–160.
34. Matter K, Yamamoto EM, Mellman I (1994) Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* 126: 991–1004.
35. Bello V, Goding JW, Greengrass V, Sali A, Dubljevic V, et al. (2001) Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPPI that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Mol Biol Cell* 12: 3004–3015.
36. Peña-Münzenmayer G, Catalán M, Comejo I, Figueroa CD, Melvin JE, et al. (2005) Basolateral localization of native ClC-2 chloride channels in absorptive intestinal epithelial cells and basolateral sorting encoded by a CBS-2 domain di-leucine motif. *J Cell Sci* 118: 4243–4252.
37. Chung HJ, Qian X, Ehlers M, Jan YN, Jan LY (2009) Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 629–634.
38. Schüle R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, et al. (1998) A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol* 54: 525–535.
39. Duvernay MT, Zhou F, Wu G (2004) A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 279: 30741–30750.
40. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM (2005) The dileucine motif at the COOH terminus of human multidrug resistance P-glycoprotein is important for folding but not activity. *J Biol Chem* 280: 2522–2528.
41. Robert J, Clauser E, Petit PX, Ventura MA (2005) A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 2300–2308.
42. Carrel D, Hamon M, Darmon M (2006) Role of the C-terminal di-leucine motif of 5-HT1A and 5-HT1B serotonin receptors in plasma membrane targeting. *J Cell Sci* 119: 4276–4284.
43. Dong C, Flîpeanu CM, Duvernay MT, Wu G (2007) Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1768: 853–870.
44. Ludwig T, Theissen SM, Morton MJ, Caplan MJ (2008) The cytoplasmic tail dileucine motif LL572 determines the glycosylation pattern of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 283: 35410–35418.
45. Seabold GK, Wang PY, Petralia RS, Chang K, Zhou A, et al. (2012) Dileucine and PDZ-binding motifs mediate synaptic adhesion-like molecule 1 (SALM1) trafficking in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287: 4470–4484.

Differential expression of the Kv1 voltage-gated potassium channel family in the rat nephron

Rolando Carrisoza-Gaytán · Carolina Salvador ·
 Beatriz Diaz-Bello · Laura I. Escobar

Received: 13 April 2014 / Accepted: 11 June 2014 / Published online: 20 June 2014
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Several potassium (K^+) channels contribute to maintaining the resting membrane potential of renal epithelial cells. Apart from buffering the cell membrane potential and cell volume, K^+ channels allow sodium reabsorption in the proximal tubule (PT), K^+ recycling and K^+ reabsorption in the thick ascending limb (TAL) and K^+ secretion and K^+ reabsorption in the distal convoluted tubule (DCT), connecting tubule (CNT) and collecting duct. Previously, we identified Kv1.1, Kv1.3 and Kv1.6 channels in collecting ducts of the rat inner medulla. We also detected intracellular Kv1.3 channel in the acid secretory intercalated cells, which is trafficked to the apical membrane in response to dietary K^+ to function as a secretory K^+ channel. In this work we sought to characterize the expression of all members of the Kv1 family in the rat nephron. mRNA and protein expression were detected for all Kv1 channels. Immunoblots identified differential expression of each Kv1 in the cortex, outer and inner medulla. Immunofluorescence labeling detected Kv1.5 in Bowman's capsule and endothelial cells and Kv1.7 in podocytes, endothelial cells and macula densa in glomeruli; Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.7 in PT; Kv1.2, Kv1.4 and Kv1.6 in TAL; Kv1.1, Kv1.4 and Kv1.6 in DCT and CNT and Kv1.3 in DCT, and all the Kv1 family in the cortical and medullary collecting ducts. Recently, some hereditary renal syndromes have been attributed to mutations in K^+ channels. Our results expand the repertoire of K^+ channels that contribute to K^+ homeostasis to include the Kv1 family.

Keywords Potassium channel · Kidney · Glomeruli · Proximal tubule · Thick ascending loop · Distal convoluted tubule · Connecting tubule · Collecting duct · Nephron

Introduction

Voltage-gated potassium (K^+) channels (Kvs) comprise one of the most widely distributed ion channels in mammal cells. In the kidney, K^+ channels allow the recovery of the cell negative resting membrane potential during transepithelial sodium (Na^+) reabsorption by sodium-dependent carriers and the amiloride-sensitive epithelial sodium channel (ENaC). At the same time, K^+ channels behave as osmoregulators limiting cell swelling induced by Na^+ influx into the epithelial cells (Hebert et al. 2005).

Different ion channels and transporters perform the orchestrated ion fluxes to converge to Na^+ absorption and K^+ absorption, K^+ recycling and/or K^+ secretion in a nephron.

The bulk of K^+ reabsorption in the proximal tubules is controlled via two paracellular mechanisms: solvent drag and passive diffusion. K^+ channels in the proximal tubule contribute to maintaining the cell negative membrane potential and cell volume to sustain Na^+ -coupled transport (glucose, amino acids, phosphate, bicarbonate, sulfate, citrate). Multiple K^+ channels have been identified in the proximal tubules of different animals: Maxi-K channels (Bellemare et al. 1992; Hirano et al. 2001; Kawahara et al. 1991; Merot et al. 1989; Tauc et al. 1993) and ATP-sensitive K^+ channels (Noulin et al. 1999) in the rabbit; Maxi-K channels in amphibian (Filipovic and Sackin 1991); an ATP and pH sensitive Kir channel in human cultured cells (Nakamura et al. 2001) and the KCNQ1 (Kv7.1) and KCNA10 channels in mouse (Vallon et al. 2001).

R. Carrisoza-Gaytán · C. Salvador · B. Diaz-Bello ·
 L. I. Escobar (✉)
 Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad
 Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico
 e-mail: laurae@unam.mx

The $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ NKCC2 transporter and the inwardly rectifying K^+ channel ROMK are coupled to Na^+ absorption and K^+ recycling at the apical membranes of the thick ascending loop of Henle (TAL). Maxi- K^+ channels have also been detected by patch clamp analysis in the apical membrane of the TAL (Hebert et al. 2005), but it is still uncertain if they participate in K^+ recycling. Sustained activity of the NKCC2 requires K^+ recycling across the apical membrane of TAL cells to provide an adequate supply of K^+ . The apical K^+ conductance is also important for the generation of the lumen-positive potential difference, which provides a significant driving force for passive reabsorption of cations along the paracellular pathway in the TAL. Therefore, features of K^+ reabsorption include two transport steps: apical uptake by the secondary active electro-neutral NKCC2 transporter and passive exit across the basolateral membrane by diffusion through K^+ channels and by K^+ cotransport with Cl^- through KCC4 (Velazquez and Silva 2003) and $\text{K}^+/\text{HCO}_3^-$ (Greger 1985; Level et al. 1992).

There are few studies of K^+ channels in the rabbit (Taniguchi et al. 1989) and mouse distal convoluted tubule (DCT) (Lourdé et al. 2002). In this segment the activity of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying K^+ channels, in a tandem with Na^+-K^+ -ATPase, perform K^+ recycling across the basolateral membrane (Hamilton and Devor 2012), providing the driving force for Na^+ and Cl^- reabsorption.

Na^+ and K^+ balance are achieved in the distal nephron and the collecting duct under hormonal control (ASDN) by aldosterone, vasopressin, angiotensin and insulin. The mammalian ASDN plays an important role in K^+ handling by the nephron (Muto 2001). K^+ is transported into the cell across the basolateral Na^+-K^+ -ATPase pump and, under basal conditions, is secreted into the urinary space by passive diffusion through the apical ROMK channel (Giebisch 1998). Other secretory K^+ channels may operate in the distal nephron under certain conditions: the flow-stimulated calcium and voltage dependent Maxi K channel (Woda et al. 2001, 2003) and the Kv1.3 channel activated by dietary K^+ loading (Carrisoza-Gaytán et al. 2010). In fact, dietary K^+ also regulates the ROMK channel (Palmer et al. 1994; Palmer and Frindt 1999) and Maxi-K channel (Najjar et al. 2005): low K^+ intake decreases, whereas high K^+ intake increases the expression of these channels.

Several inherited renal tubular disorders have been ascribed to mutations in K^+ channels. For example, mutations in the ROMK channel cause type II antenatal Bartter's syndrome with maternal polyhydramnios and postnatal polyuria, impaired urine concentration ability, and hypercalciuria (Hebert 2003; Simon et al. 1996). Mutations in the K^+ channel gene KCNJ10 (Kir4.1) cause the autosomal recessive EAST syndrome, characterized by

epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and a salt-wasting tubulopathy caused by transport defects in the distal convoluted tubule (DCT), where Kir4.1 plays a pivotal role as a basolateral K^+ channel (Bockenhauer et al. 2009). Autosomal dominant hypomagnesemia, a wasting Mg^{2+} syndrome, is caused by the N255D mutation in the Kv1.1 channel. This K^+ channel is expressed in the luminal membrane of the DCT where Mg^{2+} influx through the TRPM6 channel occurs (Glaudemans et al. 2009).

Previously, we identified the voltage-gated K^+ channels Kv1.1, Kv1.3 and Kv1.6 (Escobar et al. 2004; Carrisoza-Gaytán et al. 2010) and ERG1 or Kv1.1 channel (Carrisoza-Gaytán et al. 2010) in the rat kidney. Since Kv1.1 and Kv1.3 perform relevant tasks in the kidney cells, in this present work we performed a systematic assessment of the expression and immunolocalization of all members of the Kv1 family: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 and Kv1.7, in the rat nephron. Remarkably, we found differences in the abundance and localization of the Kv1 subtypes suggesting a distinct contribution to K^+ homeostasis in the rat nephron.

Materials and methods

Animals

Adult (200–250 g) male Wistar rats were housed in the animal care facility at the School of Medicine, UNAM. All animals were allowed free access to sterile distilled water and chow (Harlan-Teklad, Madison, WI). Animals were euthanized in accordance with the Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Animal protocols were approved by the Committee at the School of Medicine, as appropriate. Animals were anesthetized by intraperitoneal administration of pentobarbital sodium.

RNA purification and RT-PCR assays

Male Wistar rats (200–250 g) were anesthetized by intraperitoneal administration of pentobarbital sodium. Brain and kidneys were aseptically removed. Total RNA was extracted with trizol (Invitrogen) as previously reported (Escobar et al. 2004). RNA (5 μg) from each sample was converted to cDNA using the random primer p(dN)6 (Roche Diagnostics) and reverse transcribed with MLV reverse transcriptase (Invitrogen), according to manufacturer instructions. Contaminating DNA was removed with DNase I (Ambion). cDNA products from cerebellum and kidney were used as templates for PCR amplifications with DNA polymerase (Invitrogen) in a 50 μl reaction. Kv channels were amplified with specific primers (Invitrogen) according to the conserved amino acid sequences at the pore region and the carboxyl terminus.

Table 1 Primers used to amplify the conserved amino acid sequence at the pore region and the carboxyl terminus of the Kv1 channels

Channel	Primers	Accession No.	Fragment (bp)
mKv 1.1	Sense 5'GAAGAAGCTGAGTCGCACCTTCTCCAGTATC 3'	M30439	441
	Antisense 5'CATCCTCGAGTTAAACATCGGTCAGGAGCTTGCTCTT 3'		
rKv1.2	Sense 5'GATGAGCGAGATTCCCAGTTCCCCAGCATC 3'	M74449	447
	Antisense 5'CATCCTCGAGTCAGACATCAGTTAACATTTTGGTAAT 3'		
rKv1.3	Sense 5'CTGTGCATCATCTGGTCTCCTTTGAGCTG 3'	NM019270	828
	Antisense 5'CATCCTCGAGTTAGACATCAGTGAATACTTTTTGAT 3'		
rKv1.4	Sense 5' GAACCTACCAACCCATTTCCAAAGCATTTCCA 3'	M32867	456
	Antisense 5'CATCGGTACCTCACACATCAGTCTCCACAGCCTTTGC 3'		
mKv1.5	Sense 5' AATCAGGGTTCGCAACTCTCCAGTATCCCG 3'	L22218	468
	Antisense 5'CATCCTCGAGTTACAAATCTGTTTCCCGGCTAGTGTC 3'		
rKv1.6	Sense 5' GTTGACTCGCTCTTCCCTAGCATCCAGAT 3'	X17621	387
	Antisense 5'CATCCTCGAGTCAAACCTCGGTGAGCATCCTTTTCTC 3'		
mKv1.7	Sense 5'GGTGTGGGCCAGCCGGCTATGTCCTGGCC 3'	NM010596	576
	Antisense 5'CATCCAGCTGTACACCTCAGTCACCATGTGTTTCCC3'		

cDNA products from cerebellum and kidney were used directly as templates for PCR amplifications with DNA polymerase (Invitrogen) in a 50 µl reaction. Kv channels were amplified with primers (Invitrogen) according to the conserved amino acid sequences at the pore regions and the carboxyl terminus (Table 1). The DNA fragments were amplified using the following program: 94 °C 1 min, 50 °C 1 min and 72 °C 1 min during 40 cycles for channels: Kv1.2 and Kv1.7, respectively, and 94 °C 1 min, 54 °C 1 min and 72 °C 1 min during 40 cycles for channels: Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.6. 7.5 µl from PCR reaction fragments were run in a 1 % agarose gel in TBE buffer. cDNA fragments were purified from the agarose gel (Pure Link QuickGel Extraction Kit) for further sequencing (ABI Prism 310, Perkin Elmer).

Immunoblots

The kidney and cerebellum (Ce) were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Kidney was sectioned into cortex (Cx), outer medulla (OM) and inner medulla (IM). Tissues were homogenized in a solution containing (mM): 250 sucrose, 1 EDTA, 1 PMSF, 10 Tris HCl buffer pH 7.6 and protease cocktail inhibitor complete mini (Roche). Large tissue debris and nuclear fragments were removed by two low speed centrifugations (1,000g, 10 min each).

Protein concentration was measured with the Bio-Rad D C protein assay (Bio-Rad). Samples containing 100 µg of protein were denatured in Laemmli sample buffer (BIO-RAD) and beta-mercaptoethanol (5 %), electrophoretically separated in 10 % SDS-PAGE and electroblotted to a nylon membrane (Amersham Biosciences). The membrane was blocked with 5 % nonfat dry milk (Bio-Rad) in a Tris buffered saline pH 7.6 (TBS) at 4 °C overnight, incubated with the corresponding rabbit anti Kv1.x (Alomone, Table 2), diluted in 0.1 % Tween 20 in TBS at 4 °C overnight, and incubated with the secondary antibody of donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (1:5,000; Amersham Biosciences) at room temperature for 1 h. Blots were developed with ECL plus Western blot detection reagents (Amersham Biosciences). A cerebellum sample was used as positive control. Primary antibodies preincubated with their antigen control (Alomone) which served as negative control.

Immunofluorescence and confocal imaging

Tissue preparation and immunofluorescence staining were developed as previously reported (Carrisoza-Gaytán et al. 2010). Rat kidneys were fixed by retrograde perfusion via the aorta with 4 % paraformaldehyde in PBS. Kidneys were removed and fixed overnight. After fixation, tissues

Table 2 Primary antibodies used for western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC)

Antibodies against:	Host	Dilution for WB	Dilution for IHC
Kv1.1	Rabbit	1:300	1:100
Kv1.2		1:100	1:100
Kv1.3		1:300	1:100
Kv1.4		1:200	1:200
Kv1.5		1:200	1:100
Kv1.6		1:300	1:100
Kv1.7		1:500	1:500
Aquaporin 1	Mouse		1:50
Tamm Horsfall glycoprotein	Goat		1:100
Calbindin-D _{28k}			1:100
Aquaporin 2			1:100
H ⁺ -V-ATPase subunit B1			1:200

were cryoprotected with 30 % sucrose in the paraformaldehyde solution and frozen (−30 °C). Sagittal sections (10 μm) were cut in a cryostat (Leica, CM1100), hydrated in PBS, incubated 30 min in 10 mM citrate buffer pH 9 at 80 °C for antigen retrieval. Samples were permeabilized with 0.3 % Triton X-100 (10 min) in PBS and blocked with 1 % BSA, 5 % fetal bovine serum, 5 % donkey serum, 0.1 % Triton X-100 in PBS for 1 h. Samples were then incubated with the rabbit anti-Kv1.x antibody (Table 2) in the same solution for 24 h at 4 °C. After three washes with 0.1 % Triton X-100 in PBS (PBS-T), sections were incubated with secondary antibodies coupled Alexa 488 (donkey anti rabbit, 1:200; Molecular Probes) for 1 h. Samples were washed (three times) with PBS-T. The negative control was performed by preincubation of the antibody with the control peptide. Double immunofluorescence staining of the same sections was performed using the following nephron-segment-specific antibodies: mouse anti-aquaporin 1 (AQP1) for proximal tubule (PT), goat anti-Tamm Horsfall glycoprotein (TH) for thick ascending limb of Henle (TAL), goat anti-calbindin-D_{28k} for distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule (CNT), goat anti-aquaporin 2 (AQP2) for principal cells in CNT and collecting duct, and goat anti-H⁺-V-ATPase subunit B1 for alpha acid-secreting intercalated cells (all from Santa Cruz Biotechnology, Inc; Table 2). The secondary antibodies were donkey anti-goat coupled Alexa 594 (1:500; Molecular Probes) and horse anti-mouse coupled Texas Red (1:1,000; Vector, CA, USA). Tissues were mounted on slides with Vectashield (Vector Laboratories) and images were captured with oil immersion 40× and 63× objectives mounted on a confocal inverted microscope (Leica TCS-

SP5). Image analysis was performed with the Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite program.

Results

mRNA and protein expression of Kv1 channels in the rat kidney

RT-PCR detected Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 and Kv1.7 mRNA expression in the renal cortex, outer and inner medulla (Fig. 1a, Table 1).

Antibodies recognized the proteins at the expected molecular weights for each of the Kv1 subtypes in the cerebellum (Ce; positive control), renal cortex (CX), outer (OM) and inner medulla (IM) in the immunoblots assays: 66 kDa for Kv1.1, 70 kDa for Kv1.2 and Kv1.3, 90 kDa for Kv1.4, 55 kDa for Kv1.5, 50 kDa for Kv1.6 and Kv1.7 (Fig. 1b). Antibody adsorption was performed with the blocking peptide as the negative control (Fig. 1b + CP). The protein expression of the Kv1 subtypes was immunodetected in all renal sections with apparent higher abundance of Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.6 in the IM; however, Kv1.2 and Kv1.7 showed weak immunoreactivity on the IM compared to CX blots (Fig. 1b). The differential relative abundance detected among the kidney sections suggests a heterogeneous expression of the Kv1 family in the kidney epithelia.

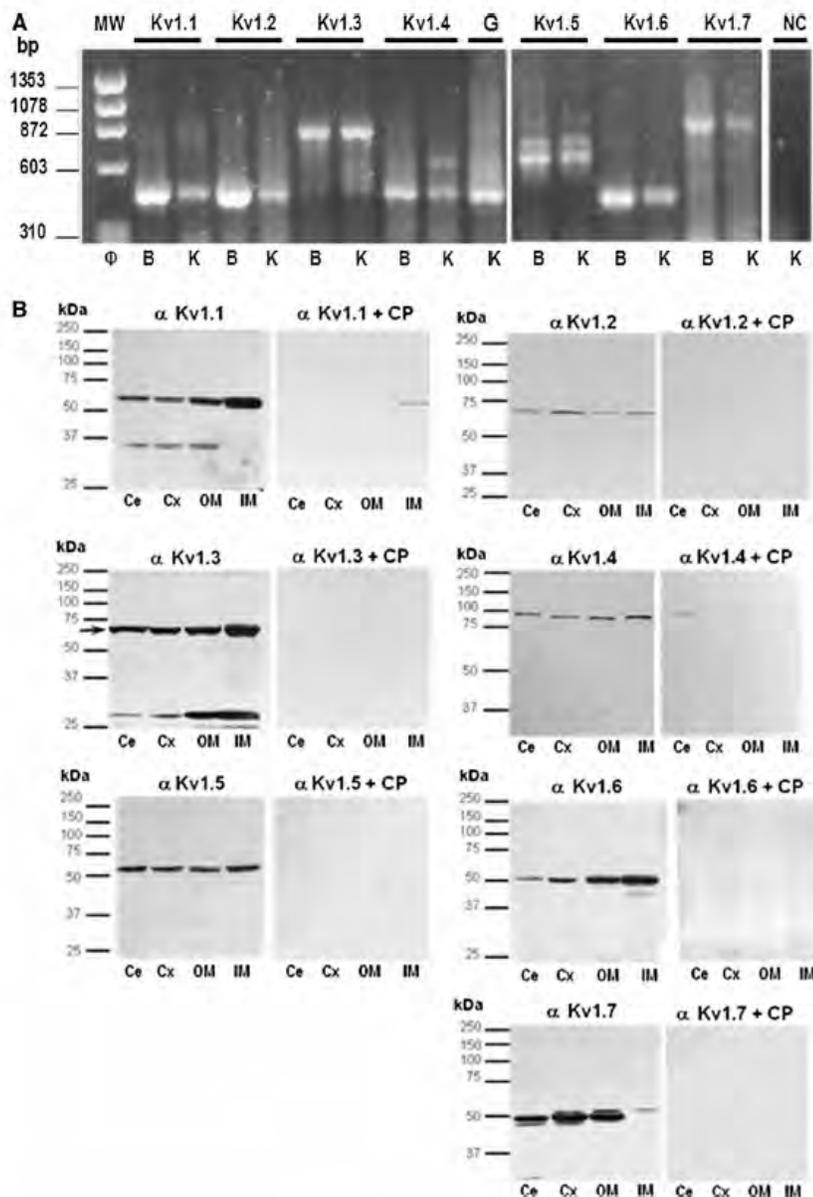
Immunolocalization of the Kv1 family in the rat nephron

The relative expression found by immunoblotting for the Kv1 proteins in the cortex was consistent with the immunofluorescence assay. Different nephron segments were labelled for each Kv1 channel in the cortex; immunoreactivity was observed for all Kv1 (Fig. 2). To determine the specific distribution of each Kv1 subtype in the nephron, colabeling with a resident protein was performed with the following findings.

Glomeruli and proximal tubules

Kv1.5 immunofluorescence labeling of Bowman's capsule cells was strong (Fig. 3a); faint and punctuate labeling of Kv1.5 was detected in endothelial cells (Fig. 3a) and renal vessels (Fig. 3d), respectively. Strong Kv1.7 immunofluorescence labeling was seen in podocytes, endothelial and macula dense cells (Fig. 3g). Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.7 in the brush border of the proximal tubules were identified by the AQP1 immunoreactivity (Fig. 4).

Fig. 1 mRNA and protein expression of Kv1 channels is detected in the renal cortex and medulla of the rat kidney. **a** Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of the Kv1 family. Brain (B) was used as tissue control for Kv1 amplifications detected in the kidney (K). Other controls were GAPDH (G) amplification 459 bp and, as negative control (NC), the PCR reaction without cDNA. The molecular weight marker (MW) was Φ X174 RF DNA/Hae III (0.5 μ g). Kv1.1 (441 bp), Kv1.2 (447 bp), Kv1.3 (858 bp), Kv1.4 (456 bp), Kv1.5 (468 bp), Kv1.6 (387 bp) and Kv1.7 (576 bp). **b** Immunoblot analysis of Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 and Kv1.7 channels from plasma membranes of cerebellum (Ce), cortex (Cx), outer medulla (OM) and inner medulla (IM) of the rat kidney. Specific antibodies against each subunit were used and the specific control peptide (+CP) was preincubated with the corresponding antibodies as negative control (right panel of each blot)



Thick ascending limb of Henle (TAL)

The Tamm Horsfall glycoprotein (TH) labeled the cortical and medullary segments of the TAL, where Kv1.2, Kv1.4 and Kv1.6 channels were identified with an intracellular pattern (Figs. 5, 6). Kv1.6 was sparsely distributed at basolateral membranes with a strong immunofluorescence in the medullary TAL.

Distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule (CNT)

Kv1.1, Kv1.4 and Kv1.6 were expressed in the epithelial cells of DCT and CNT (colabeled with calbindin-D_{28k}). Kv1.1 was always perinuclear, in contrast to the cytoplasmic and apical distribution of Kv1.3 in the DCT cells. Kv1.4 showed a punctuate staining of apical membranes of DCT

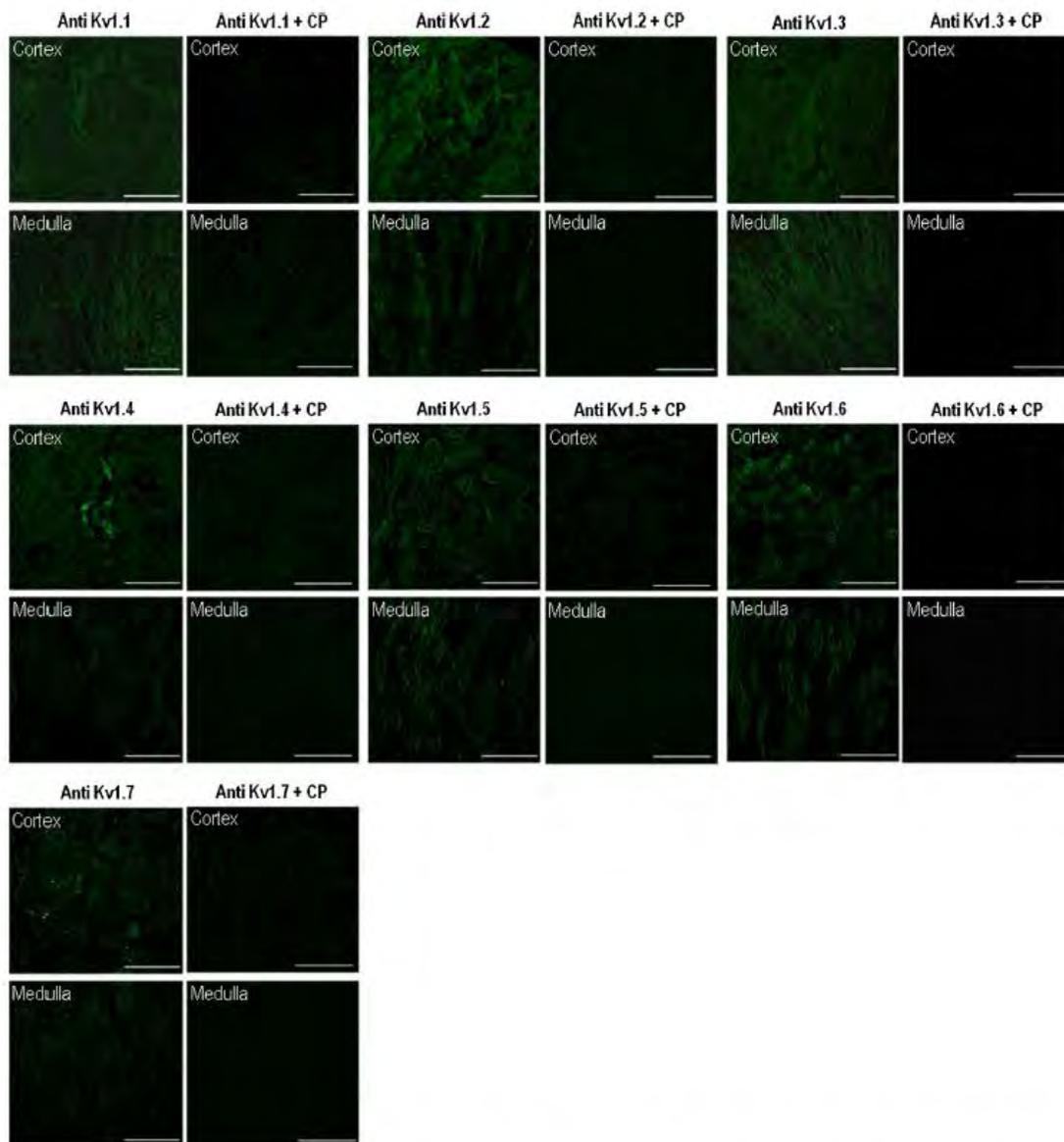


Fig. 2 Cortical and medullary immunofluorescence localization of Kv1 channels in the rat kidney. Distinct expression pattern is revealed for each Kv1 subtype in the cortex and medulla; only Kv1.5 and

Kv1.7 were observed in glomeruli. Suppression of the immunoreactivity was obtained when the antibodies were preincubated with their corresponding control peptides (CP). Scale bar 250 μ m

and CNT, whereas Kv1.6 was distributed in the cytoplasm with a basolateral profile in the DCT and CNT (Fig. 7).

Collecting ducts

All the Kv1 subtypes were localized in the cortical and medullary collecting ducts immunoreactive for AQP2 (principal

cells) and H^+ -V-ATPase (intercalated cells). Immunofluorescence staining of Kv1.1 had a perinuclear pattern in principal cells; Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.6 were cytoplasmic in principal cells, Kv1.6 also showed a basolateral profile in this segment (Fig. 8). Furthermore, Kv1.7 was identified exclusively in the apical and subapical membranes of the acid secretory intercalated cells (Fig. 8S, U).

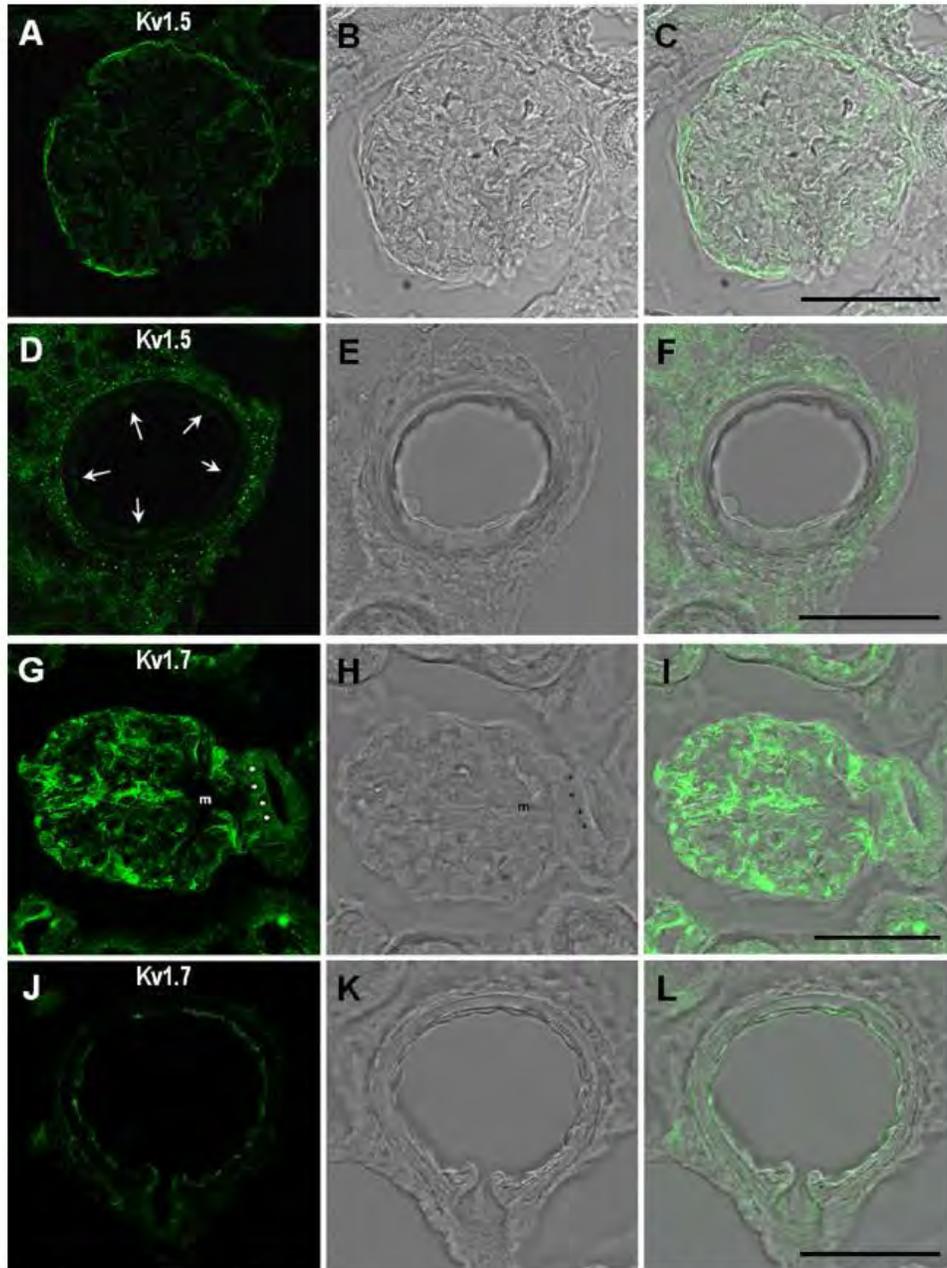


Fig. 3 Localization of Kv1.5 and Kv1.7 in glomeruli. Strong and faint Kv1.5 immunoreactivity is observed in Bowman's capsule and endothelial cells, respectively (a, b, c). Kv1.7 immunoreactivity is localized in podocytes, endothelial and macula densa cells (*asterisk*) but not in mesangial cells (*m*; g, h, i). A transverse view of renal

vessels shows expression of Kv1.5 (*arrows*; d, e, f) and Kv1.7 (j, k, l) in endothelial cells. Differential interference contrast images (b, e, h, k) allow to distinguish the cellular types of the renal corpuscle and vessels. *Scale bar* 50 μ m

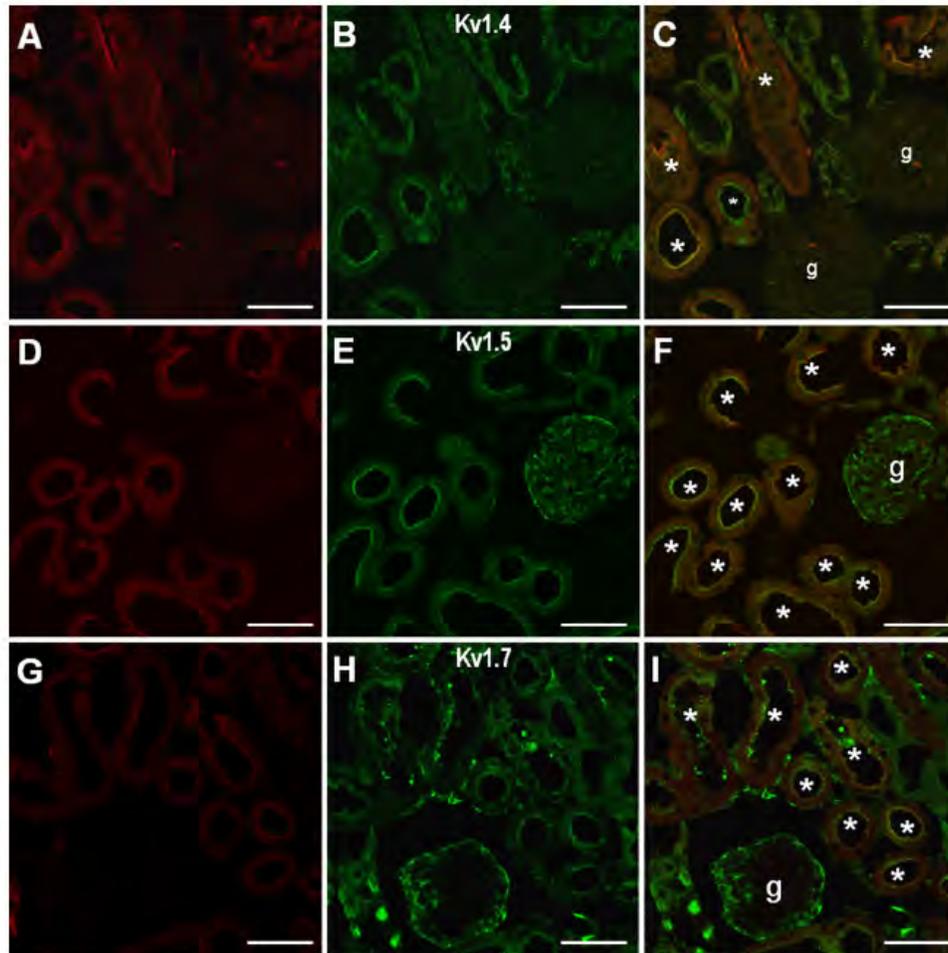


Fig. 4 Immunolocalization of Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.7 in proximal tubules. Double immunofluorescence labeling for AQP1 in brush border membranes of proximal tubules (a, d, g; red) and Kv1.4, Kv1.5, Kv1.7 channels (b, e, h; green) is shown. Merged images (c, f,

i) confirmed localization of Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.7 in the brush border membranes (asterisk). Kv1.5 and Kv1.7 were also in the glomerulus (g). Scale bar 50 μ m

Discussion

Our results show a selective membrane polarity, intracellular and tubule cell localization of the Kv1 family repertoire along the rat nephron (Table 3). The differential Kv1 distribution might be related to the specific channel gating properties for the recovery of the membrane resting potential, K^+ recycling, K^+ secretion and cell volume regulation coupled to the specific Na^+ transporters in each tubule segment of the rat nephron. Therefore, discussion below is accompanied for each nephron segment studied (Fig. 8).

Glomeruli. The glomerular capillary tuft contains four cell types: parietal epithelial cells that form Bowman’s capsule, podocytes that cover the outermost layer of the glomerular filtration barrier, glycocalyx-coated fenestrated endothelial cells, and mesangial cells that sit between the capillary loops. Fluorescence immunolabeling show a clear differential localization of Kv1.5 (Bowman’s capsule and endothelial cells) and Kv1.7 (podocytes, endothelial and macula densa cells). Several ion channels have been found in podocytes rather than in Bowman’s capsule cells. Maxi-K channels are expressed in podocytes in a complex with multiple glomerular slit diaphragm proteins including

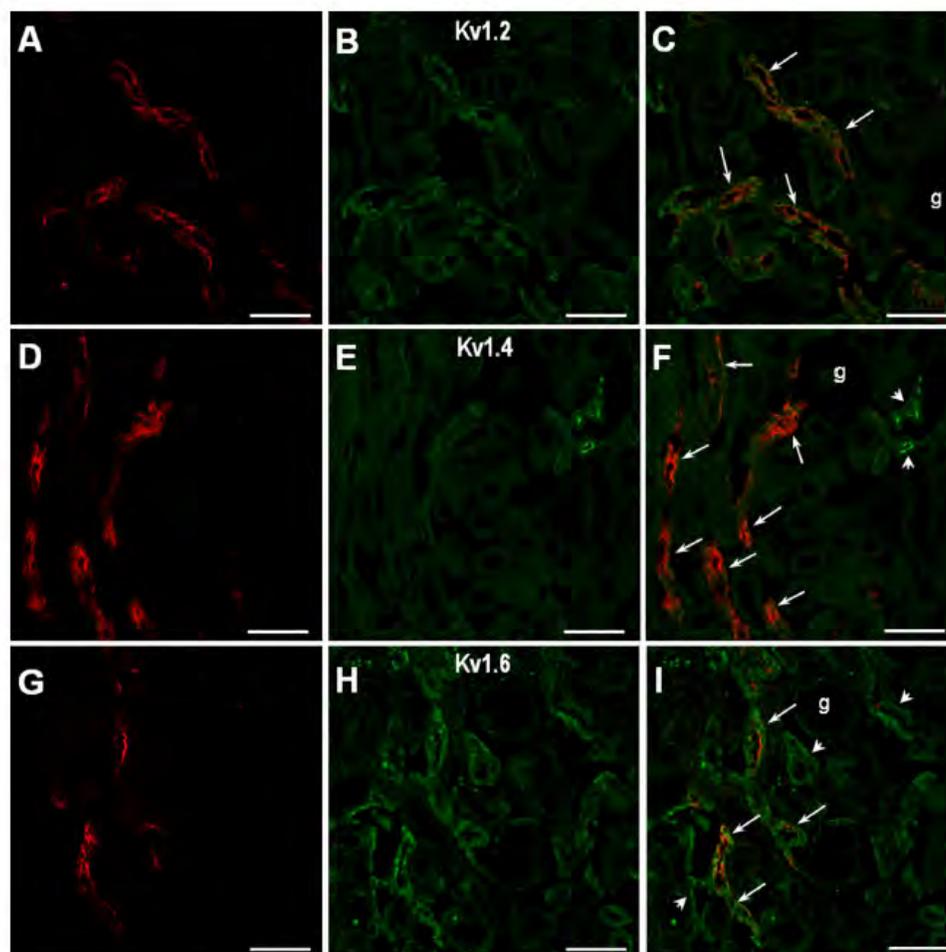


Fig. 5 Immunolocalization of Kv1.2, Kv1.4 and Kv1.6 in the cortical thick ascending limbs. Double immunofluorescence for the Tamm-Horsfall glycoprotein (a, d, g; red) and Kv1.2, Kv1.4, Kv1.6 (b, e, h; green) in the cortex is shown. Merged images (c, f, i) exhibited in the cortical thick ascending limb immunoreactivity for Kv1.2, Kv1.4

(weak) and Kv1.6 in the cytoplasm with basolateral profile (arrows). Kv1.4 stained a group of tubules with intense apical labeling presumably DCT or CNT (arrowheads). Kv1.6 also labeled other tubular structures, apparently DCT or CD (arrowheads). Scale bar = 75 μ m

nephrin, TRPC6 channels, and several different actin-binding proteins (Kim et al. 2010). Further experiments are needed to elucidate if Kv1.7 interacts with these proteins in podocytes.

Conducting Maxi-K channels have been recorded by patch-clamp. Maxi-K single-channel conductance (100–200 pS) is an order of magnitude higher than the corresponding Kv1 conductance (Frindt and Palmer 1987; Pácha et al. 1991). Kv1.7 has a small single channel conductance ($\gamma = 21$ pS) and shows a fast and accumulative inactivation (Kalman et al. 1998). Since Kv channels activate in the same voltage range, large Maxi-K currents

will mask the corresponding Kv1 currents in patch-clamping recordings of epithelial cells.

Previously, we identified an ERG1 isoform abundantly expressed in renal vessels (Carrisoza et al. 2010). In this work, Kv1.5 and Kv1.7 were identified in endothelial cells and renal vessels. K^+ conductance is determinant of membrane potential in vascular smooth muscle (VSMC) and endothelial cells (EC). The vascular tone is controlled by the activity of voltage gated- Ca^{2+} channels (vasoconstriction) in VSMC. Increased K^+ conductance causes hyperpolarization and vasodilation. K^+ channels in EC indirectly participate in the control of vascular tone.

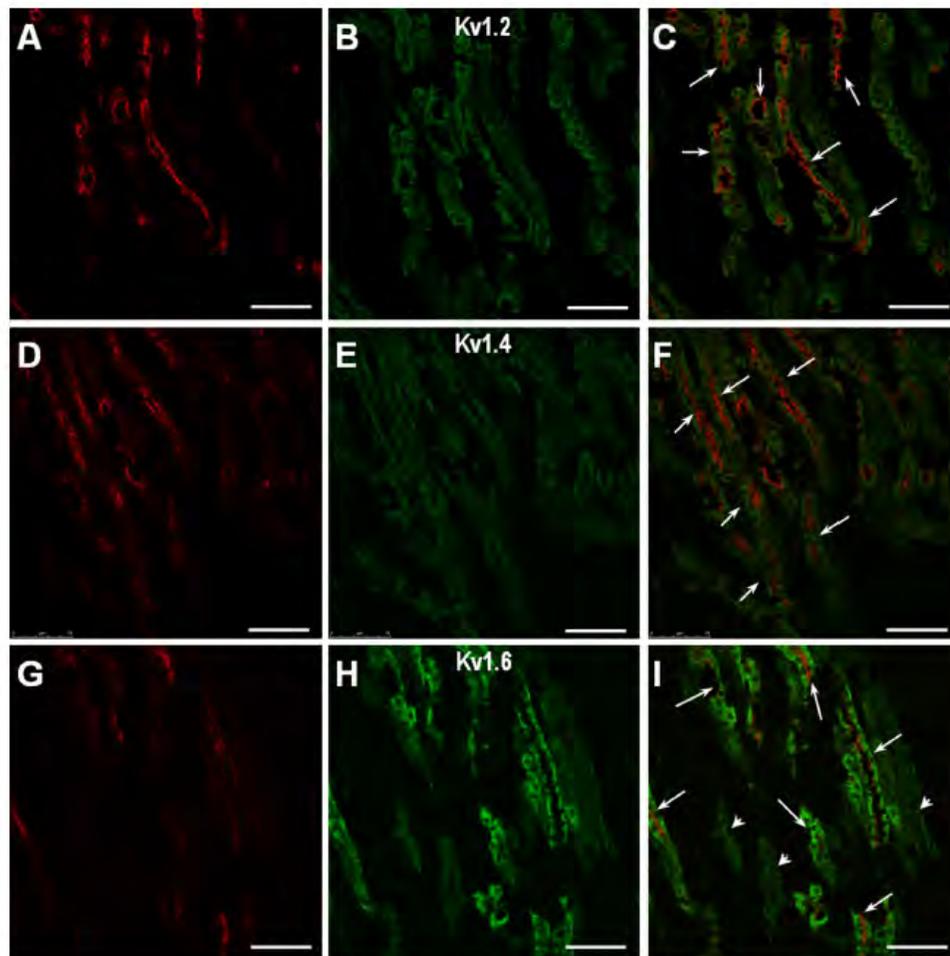


Fig. 6 Immunolocalization of Kv1.2, Kv1.4 and Kv1.6 in the outer medullary thick ascending limb. Tamm-Horsfall glycoprotein (a, d, g; red) colabeled with Kv1.2, Kv1.4, Kv1.6 (b, e, h; green) colocalized in the outer medullary thick ascending limb: merged images (c, f, i,

arrows). Note the high immunoreactivity of Kv1.6 in the thick ascending limb in contrast to other tubules, like CCD (i, arrowheads) always with a basolateral profile. Scale bar 75 μ m

Endothelium-dependent vasodilators, i.e. nitric oxide, prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factor, may activate K^+ channels allowing K^+ efflux out of the cell, causing a decrease in membrane potential and hyperpolarization and, as a consequence, closing voltage-gated Ca^{2+} channels in the cell membrane and vascular muscle relaxation. In the kidney, a change in the activity of one or more classes of K^+ channels will lead to a change in hemodynamic resistance and, then, to renal blood flow and glomerular filtration pressure. Therefore, the activity of renal vascular K^+ channels influences renal salt and water excretion, fluid homeostasis, and blood pressure. Several K^+ channels, calcium-activated (Maxi-K), inward rectifier

(Kir), voltage activated (Kv), and ATP sensitive (KATP) are found in the renal vasculature, suggesting their synergistic role in the regulation of renal vascular function (Hebert et al. 2005).

Proximal tubules Apical membrane distribution was observed with the Kv1 subtypes found in the proximal tubules. Kv1.4, Kv1.5 and Kv1.7 were detected in the apical brush border membranes of the rat proximal tubule cells, suggesting their contribution to K^+ efflux in proximal tubules, essential to counteract membrane depolarization due to the electrogenic Na^+ -coupled transport of glucose or amino acids. In contrast to luminal membranes, few K^+ channels have been identified at the basolateral membranes

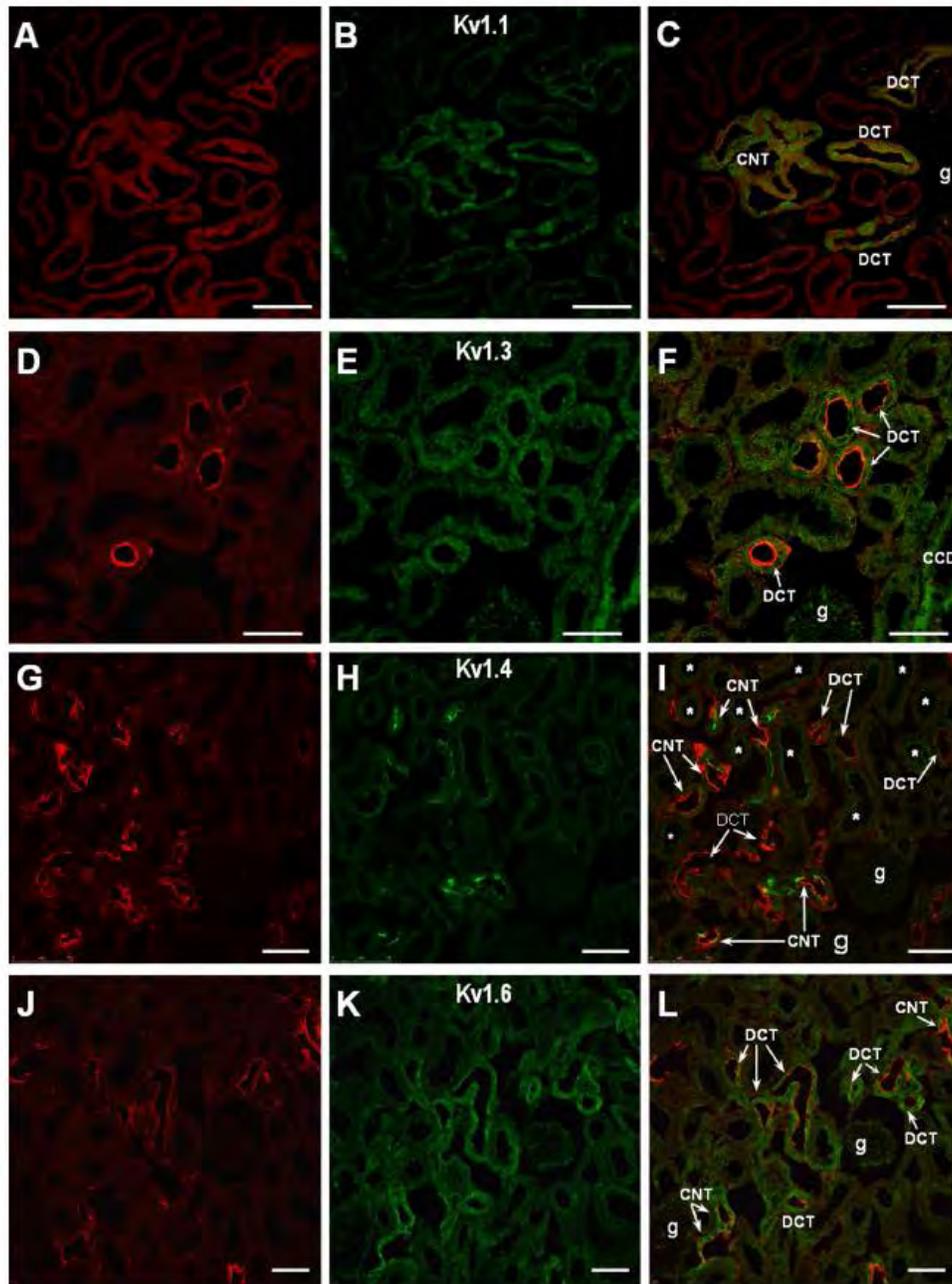


Fig. 7 Kv1 channels in the distal convoluted tubule (DCT) and connecting tubule (CNT). Positive immunoreactivity for calbindin-D_{28k} in DCT and CNT (a, d, g, j; red), and for Kv1.1 Kv1.3, Kv1.4 and Kv1.6 was observed (b, e, h, k; green) in the renal cortex. Merged images (c, f, i, l) showed a perinuclear distribution of Kv1.1 in the

DCT and CNT, apical Kv1.3 labeling in DCT, apical Kv1.4 immunoreactivity in DCT (weaker) and CNT (stronger), and Kv1.6 cytoplasmic and basolateral localization in DCT and CNT. Proximal tubules expressing Kv1.4 (*). Scale bar 75 μm

Table 3 Localization of the Kv1 channels in the rat nephron

Kv1.1			Perinuclear	Perinuclear	Perinuclear	Perinuclear
Kv1.2		Intracellular				Intracellular
Kv1.3			Intracellular apical		Intracellular	Intracellular
Kv1.4	Apical	Intracellular	Apical	Apical	Intracellular	Intracellular
Kv1.5	Glomerulus	Apical				Intracellular
Kv1.6		Intracellular, basolateral				
Kv1.7	Glomerulus	Apical			Intercalated cells, apical	

of the proximal tubule cells. In rabbit proximal tubules inwardly rectifying channels have been recorded: a high-conductance low-open probability K(ATP) channel and a low-conductance high-open probability sK channel (Noulin et al. 1999).

Thick ascending limb (TAL). Apical K⁺ uptake is against a chemical gradient and depends on coupling to Na⁺ uptake to the TAL cells along a large electrochemical gradient generated by basolateral Na⁺-K⁺-ATPase activity. Apical ROMK channels contribute to Na⁺ reabsorption in the TAL. K⁺ taken up in exchange for Na⁺ by the Na⁺/K⁺-ATPase must exit across the basolateral membrane through K⁺ channels and by the K⁺-Cl⁻ transporter KCC4. Basolateral K⁺ and Cl⁻ channels and the KCC4 and K⁺/HCO₃⁻ transporters are known to allow K⁺ reabsorption in the medullary interstitium. These ionic pathways must be functionally coupled to maintain Na⁺, K⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ reabsorption while preventing perturbations in cellular osmolarity and volume (Boron and Boulpaep 2003). According to TAL transport models, stimulating apical Na⁺ and Cl⁻ influx is expected to produce a rapid increase in the Na⁺/K⁺ ATPase-mediated Na⁺ efflux with a parallel increase in basolateral K⁺ conductance. Although the existence of basolateral K⁺ channels is known, their molecular identity has not been revealed. In this work we found a weak immunoreactivity for Kv1.2 and Kv1.4 channels in this nephron segment but an intense expression of Kv1.6 channel in the basolateral membranes of TAL cells, suggesting that Kv1.6, a delayed rectifier, contributes to K⁺ reabsorption in this nephron segment.

Interestingly, Kv1.5, Kv1.6 and Kv1.7 channels are important hypoxia-sensitive Kv channels in pulmonary artery smooth muscle cells (Wang et al. 2005; Firth et al.

2009; Chu et al. 2009) and contribute to the regulation of membrane potential and intracellular Ca²⁺ homeostasis during hypoxia. The kidney consumes a large amount of oxygen and is relatively inefficient in oxygen uptake, and therefore, is susceptible to hypoxia, especially in patients with advanced chronic kidney disease. Therefore, these Kv1 channels appear as potential regulatory targets of hypoxia in the kidney.

Distal convoluted and connecting tubule Kv1.1 appeared perinuclear in the DCT, CNT and collecting ducts. In contrast to our findings in rat nephron, Kv1.1 has been observed along the luminal membrane of DCT cells in the mouse kidney using the same antibody (Glaudemans et al. 2009). It is well known that Kv1.1 shows high endoplasmic reticulum retention in cell cultures and low cell-surface levels (Manganas et al. 2001; Zhu et al. 2003). In fact, the majority of the Kv1.1-heteromultimeric channels in the mammalian central nervous system coassembled Kv1.2 and Kv1.4 alpha-subunits, and Kvbeta1 and Kbeta2-subunits (Rhodes et al. 1997; Wang et al. 1993). Further experiments should be performed to understand the intracellular compartmentalization of Kv1.1 in the rat nephron.

Kv1.3 and Kv1.4 were apical in DCT and Kv1.4 was also apical in CNT, a fact that strongly suggests their role as secretory channels in these aldosterone-sensitive tubule segments.

Collecting ducts All the subtypes of Kv1 were identified in the CD. Kv1.2, Kv1.4 and Kv1.5 were in the cytoplasm as Kv1.3. This finding suggests that their traffic to the surface membranes might be regulated by K⁺ diets, as it is the case for Kv1.3 that is targeted to the apical membranes of alpha intercalated cells to secrete K⁺ during chronic K⁺ diets (Carrisoza-Gaytán et al. 2010). Actually, ROMK and

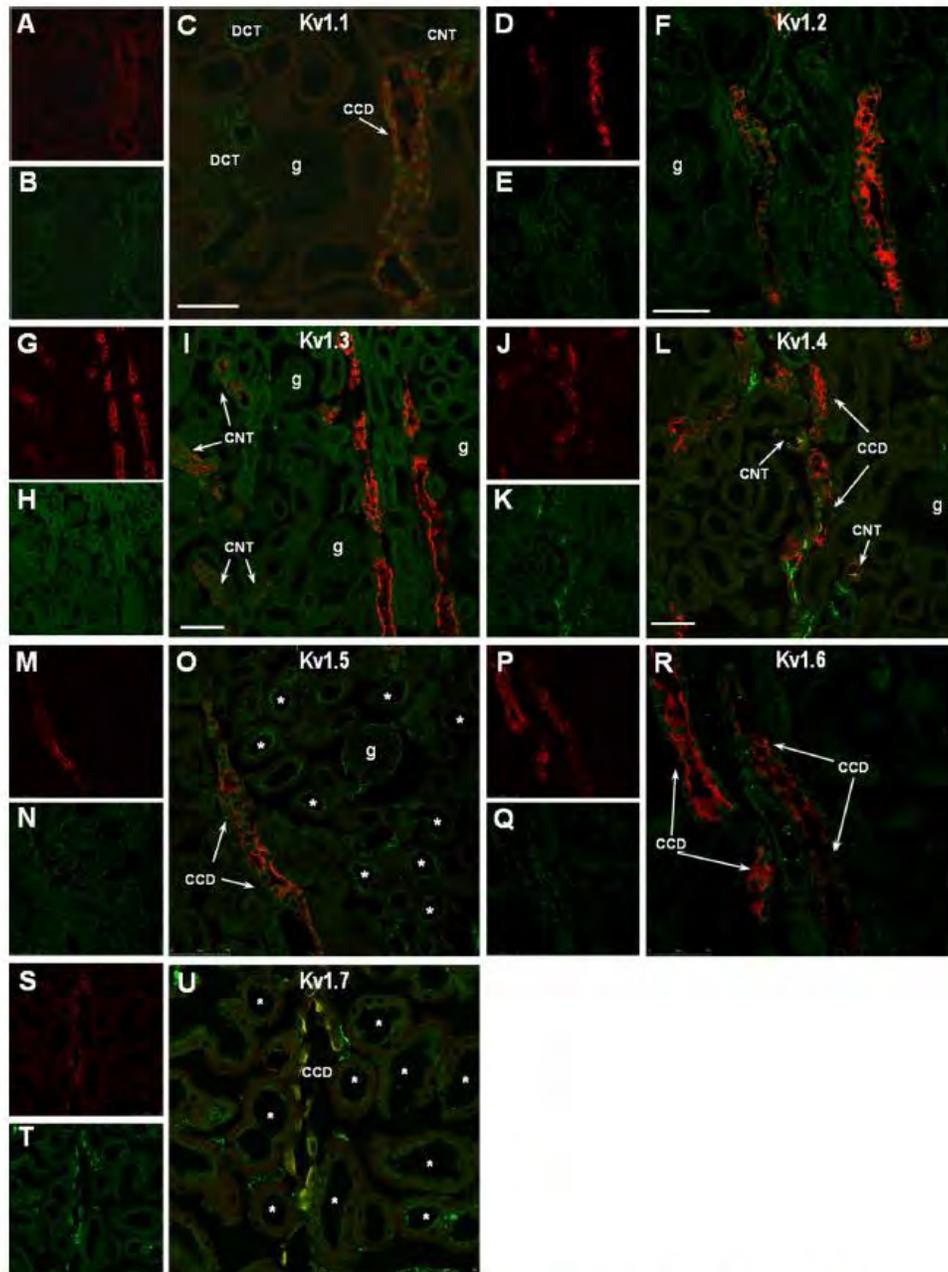


Fig. 8 Immunolocalization of all Kv1 channels in the cortical collecting duct (CCD). Double immunofluorescence for AQP2 (a, d, g, j, m, p; *red*) and Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 (b, e, h, k, n, q; *green*) exhibited all Kv1 in the CCD (merged images: c, f, i, l, o, r, u) with perinuclear localization of Kv1.1 and cytoplasmic

distribution of Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 (and basolateral). Double immunofluorescence labeling for V-ATPase (s; *red*) and Kv1.7 (t; *green*) identified Kv1.7 in the alpha intercalated cells. Merged image (u) showed Kv1.7 colocalization with V-ATPase at the apical membrane of the alpha intercalated cells. *Scale bar* 75 μ m

Maxi-K⁺ channels are also located in the cytoplasm of principal and alpha intercalated cells, respectively and, as Kv1.3, their traffic to apical membranes in distal tubules is regulated by dietary K⁺ (Hebert et al. 2005; Najjar et al. 2005; Wang and Giebisch 2009; Wade et al. 2011). Kv1.7 was localized exclusively in the apical membranes of the acid secreting intercalated cells, suggesting a role on the apical K⁺ recycling pathway, required for the H⁺ secretion accomplished by the H⁺/K⁺ ATPase, as occurs with the KCNQ1 in the acid secreting parietal cells (Grahammer et al. 2001).

The final renal regulation of Na⁺ and water absorption is closely related to secretion, recycling and excretion of K⁺. The direction and magnitude of K⁺ transport in the distinct nephron segments depend on the specific distribution of transporters in the tubule cells. K⁺ fluxes comprise either transcellular or intercellular pathways. In general, the Na⁺-K⁺-ATPase is found at the basolateral membrane and different transport mechanisms mediate K⁺ movement at the apical and basolateral membranes in the renal tubules cells. K⁺ channels contribute to the recovery of the resting membrane potential after the membrane depolarization provoked by the Na⁺-uptake. Simultaneously, K⁺ channels also participate in regulating cell volume during stimulation of Na⁺-dependent carriers since cell swelling activates both apical and basolateral K⁺ channels. The kinetic characteristics of the ion channels in an epithelial cell will determine the cell signaling profile and, therefore, the cell function in physiological processes.

Different distribution patterns were followed by the Kv1 family along the nephron: perinuclear (Kv1.1), cytoplasmic (Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.3, Kv1.6), apical (Kv1.3, Kv1.4, Kv1.7) and basolateral (Kv1.6). Accordingly, different trafficking profiles have been observed for each Kv1 subtype in cell lines: high and low ER retention and cell-surface levels (Zhu et al. 2003; Manganas et al. 2001). There is a lack of studies defining the sorting signals involved in the targeting of a Kv1 subtype to apical or basolateral membranes in epithelia. Therefore, the mechanisms that regulate surface expression of Kv1 channels in epithelia cells remain to be elucidated.

Together with previous findings, this study shows the distribution of the Kv1 family in the rat nephron and raises new questions about their regulation by different physiological conditions like high K⁺ loads, hypokalemia, hypoxia and acidosis.

Acknowledgments We thank to Facultad de Medicina, PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas and Programa de Doctorado en Bioquímica, UNAM), MVZ Silvia Reyes Maya and QFB Carmen Guadalupe Mondragón Huerta for their technical assistance with the confocal microscope (Macroproyecto “Nuevas estrategias epidemiológicas, genómicas y proteómicas en Salud Pública, SDI-PTID.05.01), Fundación para la Acidosis Tubular Renal

Infantil Mexicana, A.C. (www.funatim.org.mx, www.acidosistubular.unam.mx) and Lisa Satlin for her critical reviewing of the manuscript. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) under its research program PAPIIT IN224406 and IN214613 grants and “Programa de apoyos para la superación del personal académico de la UNAM (PASPA)” Universidad Nacional Autónoma de México; Programa de “Estancias sabáticas al extranjero para la consolidación de grupos de investigación” Conacyt # 208285 and by CONACYT CB-2011-166913 grant.

Conflict of interest The authors declared no conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication, and/or publication of this article.

References

- Bellemare F, Morier N, Sauvé R (1992) Incorporation into a planar lipid bilayer of K channels from the luminal membrane of rabbit proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 23:10–18
- Bockenbauer D et al (2009) Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 360: 1960–1970
- Boron WF, Boulpaep EL (2003) *Medical physiology*, 1st edn. Elsevier Science, Philadelphia, pp 814–827
- Carrisoza R, Salvador C, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI (2010) Expression and immunolocalization of ERG1 potassium channels in the rat kidney. *Histochem Cell Biol* 133:189–199
- Carrisoza-Gaytán R, Salvador C, Satlin LM, Liu W, Zavilowitz B, Bobadilla NA, Trujillo J, Escobar LI (2010) Potassium secretion by voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F255–F264
- Chu X, Tang X, Guo L, Bao H, Zhang S, Zhang J, Zhu D (2009) Hypoxia suppresses Kv1.5 channel expression through endogenous 15-HETE in rat pulmonary artery. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 88:42–50
- Escobar LI, Martínez-Télez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vázquez M, Bargas J, Bolívar JJ (2004) A voltage-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C965–C974
- Filipovic D, Sackin H (1991) A calcium-permeable stretch-activated cation channel in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 260:F119–F129
- Firth AL, Platoshyn O, Brevnova EE, Burg ED, Powell F, Haddad GH, Yuan JX (2009) Hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 1177:101–111
- Frindt G, Palmer LG (1987) Ca-activated K channels in apical membrane of mammalian CCT, and their role in K secretion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 252:F458–F467
- Giebisch G (1998) Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 274:F817–F833
- Glaudemans B, van der Wijst J, Scola RH, Lorenzoni PJ, Heister A, van der Kemp AW, Knoers NV, Hoenderop JG, Bindels RJ (2009) A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *J Clin Invest* 119:936–942
- Grahammer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Gräff A, Wittekindt OH, Nitschke R, Bleich M, Barhanin J, Warth R (2001) The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for acid gastric secretion. *Gastroenterology* 120:1363–1371
- Greger R (1985) Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65:760–797

- Hamilton KL, Devor DC (2012) Basolateral membrane K⁺ channels in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F1069–F1081
- Hebert SC (2003) Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:527–532
- Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 85:319–371
- Hirano J, Nakamura K, Kubokawa M (2001) Properties of a Ca²⁺-activated large conductance K⁺ channel with ATP sensitivity in human renal proximal tubule cells. *Jpn J Physiol* 51:481–489
- Kalman K, Nguyen A, Tseng-Crank J, Dukas ID, Chandy G, Hustad CM, Copeland NG, Jenkins NA, Mohrenweiser H, Brandriff B, Cahalan M, Gutman GA, Chandy KG (1998) Genomic organization, chromosomal localization, tissue distribution, and biophysical characterization of a novel mammalian Shaker-related voltage-gated potassium channel, Kv1.7. *J Biol Chem* 273:5851–5857
- Kawahara K, Ogawa A, Suzuki M (1991) Hyposmotic activation of Ca-activated K channels in cultured rabbit kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol* 260:F27–F33
- Kim EY, Suh JM, Chiu YH, Dryer SE (2010) Regulation of podocyte BK_{Ca} channels by synaptopodin, Rho, and actin microfilaments. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F594–F604
- Leviel F, Borensztein P, Houillier P, Paillard M, Bichara M (1992) Electroneutral K⁺/HCO₃⁻ cotransport in cells of medullary thick ascending limb of rat kidney. *J Clin Invest* 90:869–878
- Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J (2002) An inward rectifier K⁺ channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol* 538:391–404
- Manganas LN, Wang Q, Scannevin RH, Antonucci DE, Rhodes KJ, Trimmer JS (2001) Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14055–14059
- Merot J, Bidet M, Le Maout S, Tauc M, Poujeol P (1989) Two types of K⁺ channels in the apical membrane of rabbit proximal tubule in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 978:134–144
- Muto S (2001) Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol Rev* 81:85–116
- Najjar F, Zhou H, Morimoto T, Bruns JB, Li HS, Liu W, Kleyman TR, Satlin LM (2005) Dietary K⁺ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F922–F932
- Nakamura K, Hirano J, Kubokawa M (2001) An ATP-regulated and pH-sensitive inwardly rectifying K(+) channel in cultured human proximal tubule cells. *Jpn J Physiol* 51:523–530
- Noulin JF, Brochiero E, Lapointe JY, Laprade R (1999) Two types of K⁺ channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine. *Am J Physiol* 277:F290–F297
- Pácha J, Frindt G, Sackin H, Palmer LG (1991) Apical maxi K channels in intercalated cells of CCT. *Am J Physiol* 261:F696–F705
- Palmer LG, Frindt G (1999) Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake. *Am J Physiol* 277:F805–F812
- Palmer LG, Antonian L, Frindt G (1994) Regulation of apical K and Na channels and Na/K pumps in rat cortical collecting tubule by dietary K. *J Gen Physiol* 104:693–710
- Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Trimmer JS (1997) Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K⁺ channel complexes. *J Neurosci* 17:8246–8258
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JH, Rodríguez-Soriano J, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP (1996) Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet* 14:152–156
- Taniguchi J, Yoshitomi K, Imai M (1989) K⁺ channel currents in basolateral membrane of distal convoluted tubule of rabbit kidney. *Am J Physiol* 256:F246–F254
- Tauc M, Congar P, Poncet V, Merot J, Vita C, Poujeol P (1993) Toxin pharmacology of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in the apical membrane of rabbit proximal convoluted tubule in primary culture. *Pflügers Arch* 425:126–133
- Valton V, Grahammer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Völkl H, Warth R (2001) Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 12:2003–2011
- Velazquez H, Silva T (2003) Cloning and localization of KCC4 in rabbit kidney: expression in distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F49–F58
- Wade JB, Fang L, Coleman RA, Liu J, Grimm PR, Wang T, Welling PA (2011) Differential regulation of ROMK (Kir1.1) in distal nephron segments by dietary potassium. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F1385–F1393
- Wang WH, Giebisch G (2009) Regulation of potassium K handling in the renal collecting duct. *Pflügers Arch* 458:157–168
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1993) Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365:75–79
- Wang J, Weigand L, Wang W, Sylvester JT, Shimoda LA (2005) Chronic hypoxia inhibits Kv channel gene expression in rat distal pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L1049–L1058
- Woda CB, Bragin A, Kleyman TR, Satlin LM (2001) Flow-dependent K⁺ secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F786–F793
- Woda CB, Miyawaki N, Ramalakshmi S, Ramkumar M, Rojas R, Zamilowitz B, Kleyman TR, Satlin LM (2003) Ontogeny of flow-stimulated potassium secretion in rabbit cortical collecting duct: functional and molecular aspects. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F629–F639
- Zhu J, Watanabe I, Gomez B, Thornhill WB (2003) Heteromeric Kv1 potassium channel expression: amino acid determinants involved in processing and trafficking to the cell surface. *J Biol Chem* 278:25558–25567