



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**RELACIONES ESTRUCTURA FUNCIÓN EN EL CANAL IÓNICO PERMEABLE
A PROTONES H_{v1}**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
ESTEBAN SUÁREZ DELGADO**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ
Facultad de Medicina, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS
Facultad de Medicina, UNAM**

**Dr. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, Enero 2017



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 Institucionales

Este trabajo fue realizado con el soporte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en su apartado de Ciencia Básica apoyo 252644; de la Dirección General de Asuntos del Personal académico – Programa de apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) apoyo IN209515; ambos otorgados al Dr. León David Islas Suárez.

También quiero agradecer al CONACYT por el número de becario 576613 y la beca número 406510 que me fue asignada para mis estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

He sido un ser afortunado por haber realizado esta investigación. Existe una nutrida lista de personas que me han guiado y acompañado en esta travesía, ayudándome a llegar a donde me encuentro dando lo mejor de mi persona y a las cuales quiero agradecer.

Al Dr. León Islas Suárez, mi tutor, por su guía y enorme paciencia en enseñarme el estudio de los canales iónicos de manera científica.

A la Dra. Gisela Rangel Yescas por su comprensión, habilidad y gran ayuda en la biología molecular y en los pasos de salsa.

A los Doctores Takuya Nishigaki Shimizu y Froylán Gómez Lagunas por sus útiles y minuciosas observaciones que sirvieron de guía a este trabajo.

Al Dr. Víctor De la Rosa Jiménez por enseñarme, con una enorme disponibilidad, las técnicas y experimentos de laboratorio. A mis compañeros de laboratorio Gema Rosa Cristóbal Mondragón, Julia Carrasco Zanini y Ernesto Ladrón de Guevara Reyes por su gran apoyo para entender y manipular los equipos.

A la Bióloga Adriana Sánchez Boiso por acercarme con su amistad al camino de la investigación.

Fundamentalmente a mis padres Ricardo Suárez Avilés y Leticia Delgado Vanegas quienes siempre velaron por mí y me enseñaron la realidad de la vida y cómo afrontarla. A mi hermano Bruno por estar orgulloso de mí cuando menos lo espero.

A Nohemí, Cecilia, Rosalía, Tania y Giovanna que con su amistad y cariño me han recordado quién soy cuando más lo he necesitado.

Al Universo que nunca dejará de maravillarme.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known”

Carl Sagan

RESUMEN

El canal iónico activado por voltaje permeable a protones H_{VI} es una proteína transmembranal que se expresa en una amplia variedad de organismos y células. Tiene una estructura muy peculiar ya que carece de la porción que formaría el poro en los canales iónicos canónicos y su dominio sensor de voltaje presenta una doble función respondiendo al voltaje y conduciendo hidrogeniones. Dicho canal presenta más características que lo vuelven único. Entre ellas su alta selectividad a la conducción de hidrogeniones, la gran velocidad con lo que lo hace, su capacidad de modular su activación dependiendo de la concentración de protones a ambos lados de la membrana celular permitiéndole expulsar protones del medio intracelular; su presentación en dímeros en la mayoría de organismos y las múltiples funciones que realiza dentro de los mismos, desde el control de la acidez intracelular, pasando por la compensación de cargas eléctricas hasta la maduración de ciertas estirpes celulares. Si es cierto que en la última década el estudio de este canal ha permitido caracterizar parte de su comportamiento, existen elementos de su estructura que aún se desconocen, propiciando que componentes de su fisiología como el mecanismo de activación y los movimientos conformacionales que a éste se relacionan siguen siendo motivo de especulación.

En este trabajo se pensó que podría estudiarse los cambios conformacionales con una combinación de dos técnicas que miden la electrofisiología del canal (Patch-clamp) mientras se estima el FRET –Transferencia de Energía de Fluorescencia por Resonancia por sus siglas en inglés - (un fenómeno que puede ser utilizado como una regla molecular del orden de angstroms) de diferentes sondas fluorescentes que se encuentran unidas al canal y embebidas en su ambiente próximo. Esto se logró fusionando a través de biología molecular dos proteínas fluorescentes (Venus y tagRFP) al cuarto segmento transmembranal del canal iónico (S_4), que es donde se encuentran las cargas que censan el voltaje del canal, y se estimó el movimiento perpendicular de este segmento valorando la transferencia de FRET de las proteínas fluorescentes a una molécula aceptora llamada Dipicrilamida (DPA), que no emite luz y que se encuentra embebida en la membrana. Los experimentos se realizaron con el canal en reposo y en su estado activado.

Al final, se pudo estimar la distancia a la cual se encuentra la proteína fluorescente de la membrana celular y caracterizar de manera cualitativa el movimiento perpendicular del S_4 con respecto a la membrana durante la activación del canal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Canales iónicos	8
1.2 Canal iónico permeable a protones H_{V1}	13
1.2.1 Filogenia.....	13
1.2.2 Estructura.....	14
1.2.3 Características Electrofisiológicas.....	16
1.2.4 Funciones Biológicas	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Biología Molecular.....	25
5.2 Expresión en ovocitos de rana <i>Xenopus laevis</i>	28
5.3 Electrofisiología.	29
5.4 Fluorescencia.....	33
5.4.1 Bases teóricas de FRET	33
5.4.2 Obtención de Datos.....	38
5.4.3 Elección de las proteínas fluorescentes.	40
5.5 Patch-Clamp Fluorometry.....	41
5.6 Membrane Sheets o sábanas de membrana	43
6. RESULTADOS	49
6.1 Expresión y evaluación de proteínas fluorescentes tagRFP	49
6.2 Medición de la distancia entre la membrana y las proteínas fluorescentes.....	51
6.3 Medición del movimiento del S_4 del canal $H_{V1}\Delta C$ -Venus.....	56
6.3.1 Construcción $H_{V1}\Delta C$ -Venus.....	56
6.3.2 Construcción H_{V1} -Venus.....	59
6.3.3 Construcción H_{V1} -tagRFP.....	61
7. DISCUSIÓN	65

7.1 Distancia entre la proteína fluorescente y la membrana.....	65
7.2 Apagamiento por el movimiento de S4.....	66
7.3 Electrofisiología de las construcciones.....	68
8. CONCLUSIONES.....	72
9. PERSPECTIVAS.....	73
10. BIBLIOGRAFÍA	75

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Canales iónicos

Para el desarrollo tan complejo de la vida como la conocemos hoy en día fue fundamental la evolución de una membrana celular que permitiera mantener, en un espacio reducido, los metabolitos que participan en las reacciones químicas que soportan la homeostasis celular. Sin embargo, de igual manera es importante mantener la relación con el medio externo ya que es necesaria tanto la captación de nuevos sustratos para metabolizar, así como la expulsión de metabolitos de desecho [7].

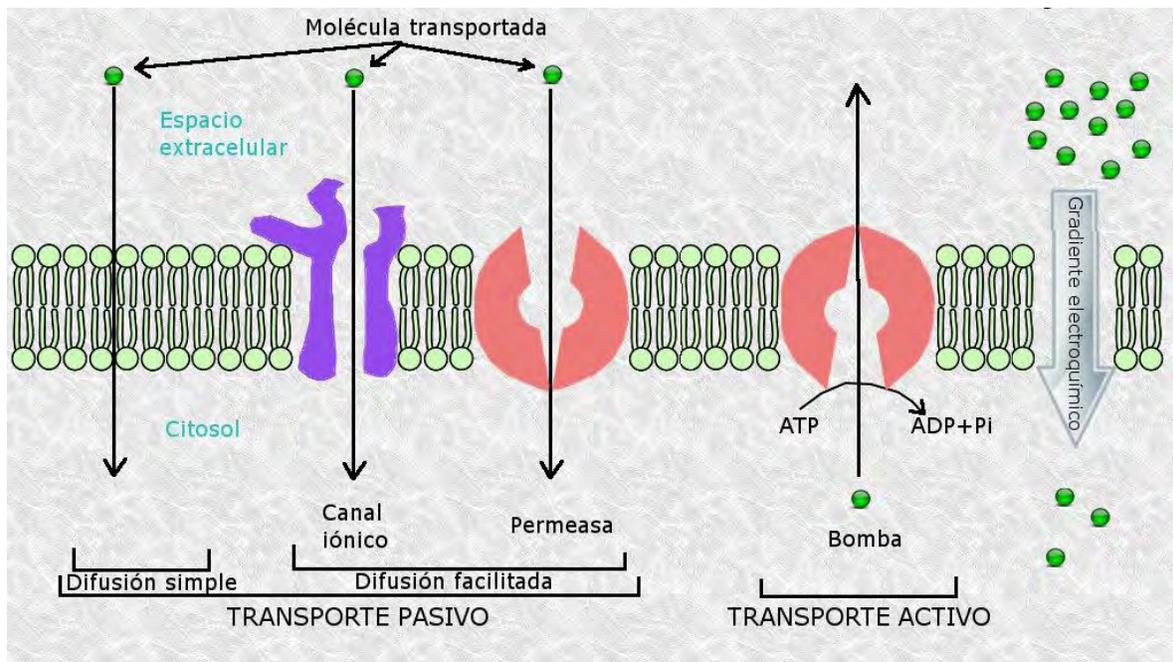


Figura 1. Esquema representativo de los mecanismos de transporte celular a través de la membrana. La molécula en violeta representa a un canal iónico. Tomado de [3]

Los mecanismos de transporte de membrana que se han desarrollado a través de la evolución de la vida se pueden clasificar en distintos tipos: la endocitosis, la exocitosis, el transporte activo, que implica la hidrólisis de una molécula de ATP para el movimiento en contra del gradiente electroquímico del sustrato a transportar (Figura 1); y el transporte pasivo, que va a favor del gradiente electroquímico del sustrato además de no involucrar el gasto de energía adicional, como la difusión

simple de gases (O_2 y CO_2) y la difusión facilitada mediada por canales proteínicos que pueden activarse mediante la unión de un ligando, un ion o por cambio en el voltaje de membrana (Figura 2).

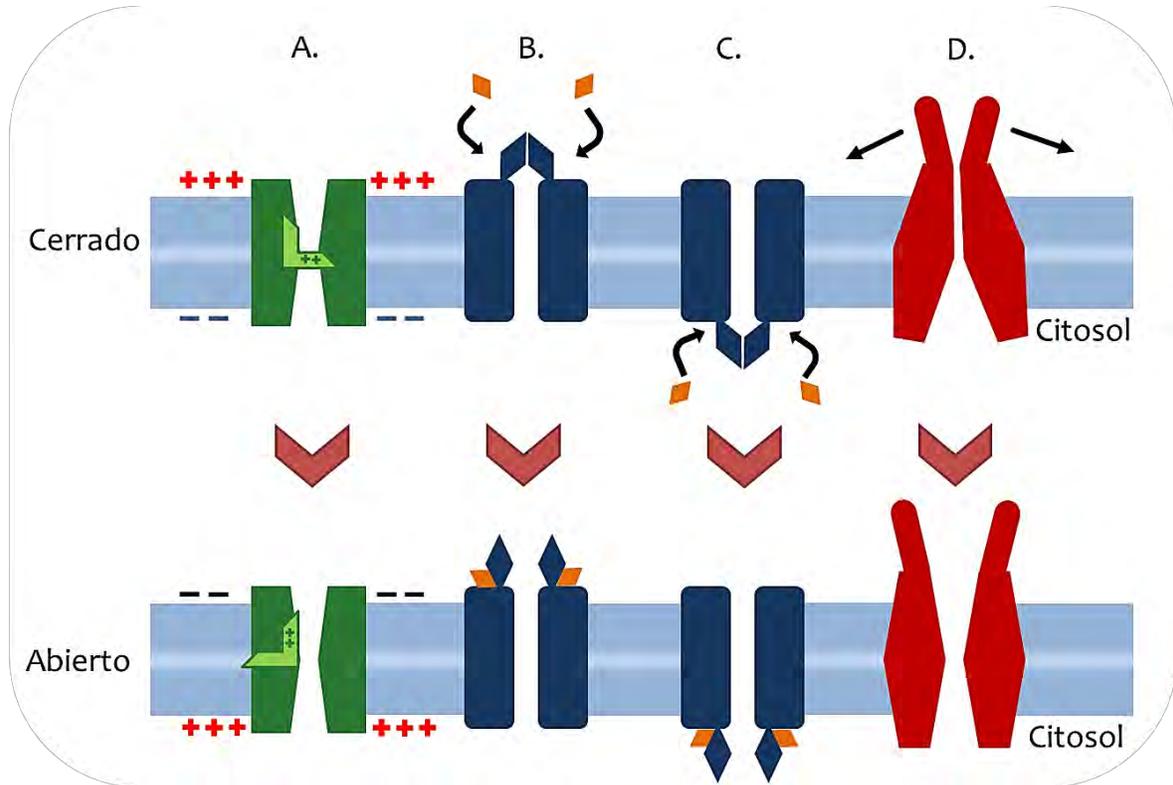


Figura 2. Representación de los tipos de canales iónicos que se encuentran en los organismos y sus diferentes mecanismos de activación. A. Canal iónico activado por voltaje; nótese el movimiento de la compuerta de activación (verde claro) debido a voltaje. B. Canal iónico activado por unión de ligando extracelular. C. Canal iónico activado por ligando intracelular. D. Canal iónico activado mecánicamente. Modificado de [4]

Estos canales proteínicos son de las estructuras moleculares más difundidas entre los seres vivos, encontrándose desde en organismos unicelulares hasta en la totalidad de los eucariontes. Esta gran difusión es debida al amplio número de funciones que desempeñan en las células en donde se encuentran: como regulación de osmolaridad, acidez y liberación de hormonas. Sin embargo su papel más destacable se encuentra en los tejidos excitables (sistema nervioso, músculo, órganos sensoriales) que permiten al organismo interactuar con el ambiente que lo rodea, percibir su realidad, procesar información, realizar movimientos y desarrollar conductas.

Para permitir una coordinación exacta entre las distintas tareas, los organismos diseñaron sistemas de movimiento de cargas a través de la membrana usando canales proteínicos específicos para los principales iones que se encuentran en el medio intracelular y extracelular (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-). Los movimientos orquestados de dichos iones permiten generar y transmitir señales eléctricas que no usarán un gasto de energía adicional ya que el movimiento provocado por el gradiente electroquímico de los iones establecido por la naturaleza propia del citosol celular.

Estructuralmente dichas proteínas presentan morfologías muy variadas, sin embargo, cada canal iónico posee atributos específicos que permiten su perfecto acoplamiento en la creación de señales eléctricas. Dentro de las más relevantes características de dichos canales se halla el mecanismo de activación, que puede estar relacionado con la unión de un ligando químico a un sitio específico del canal, al cambio de potencial eléctrico membranaral o a una deformación mecánica. Este proceso de activación es seguido por un cambio conformacional acoplado a la apertura del poro del canal, moviendo un dominio en la estructura llamada compuerta de activación. Este acoplamiento se le conoce en inglés como “gating”. Por ejemplo, en un canal activado por voltaje, se encuentran en su secuencia de aminoácidos residuos cargados repartidos en las hélices de la proteína (arginina o lisina) que censarán una fuerza electrostática a través de la membrana e inducirán un cambio conformacional cuando el potencial de la membrana cambie, afectando así el estado de la compuerta de activación, lo que desencadena la apertura o el cierre del canal.

Otra de las características cruciales para la transmisión de señales es su gran eficiencia en el transporte de los iones, permitiendo flujos del orden de 10 millones de iones por segundo a favor del gradiente electroquímico de dicho ion. A pesar de esta velocidad, un canal tiene la capacidad de conducir específicamente un tipo de ion gracias a un arreglo en la región del poro que se llama filtro de selectividad que es capaz de discriminar entre los diferentes tipos de iones. Esta selección se debe a que

los residuos de aminoácidos en el filtro de selectividad interactúan preferentemente con un ion, lo que permite su paso a través del canal con mayor facilidad o permeabilidad [8]. Un ejemplo son los canales de potasio que tienen una predilección a conducir K^+ cerca 1000 veces más que el Na^+ , sin embargo, esta característica es flexible, si estos canales se encuentran en un ambiente de baja concentración de potasio conducirán cationes de manera más inespecífica.

Una característica más que hay que mencionar es que el transporte de iones a través de canales iónicos es de tipo pasivo, por lo que también se debe tener en cuenta las características propias de la membrana y la distribución de los iones a ambos lados de ella. Eléctricamente, la membrana puede ser representada y estudiada como un capacitor en el que la distribución de las cargas del lado extracelular e intracelular genera una diferencia de potencial. Esta diferencia es generada por la presencia de aniones celulares no permeables a la membrana (nucleótidos y proteínas), la acción del transportador ATPasa Na^+/K^+ (que deja una carga neta negativa en el lado intracelular) y la acción basal de canales iónicos que exportan potasio al espacio extracelular. Este capacitor tiene conectados en paralelo conductancias que representan a los canales iónicos que permiten que el capacitor se cargue y se descargue condicionado al movimiento de los iones por estos canales. El flujo de la corriente de los iones por los canales es impulsado por la diferencia de potencial y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana, lo cual establece su potencial electroquímico. El potencial electroquímico de cada ion es la fuerza que moverá a las cargas de uno u otro lado del capacitor. El potencial electroquímico se encuentra en equilibrio cuando el potencial de membrana es igual al potencial de equilibrio del ion, el cual se calcula con la ecuación de Nernst. Así, cuando un conjunto de canales iónicos específicos para un ion, por ejemplo Na^+ , se abren (ya sea porque su sensor de voltaje se movió, se unió un ligando que produjo un cambio conformacional o sufre un estímulo mecánico) el Na^+ entrará a la célula impulsado por su potencial electroquímico derivado de su gradiente de concentración (en

condiciones fisiológicas normalmente se encuentra en mayor concentración fuera de la célula que en el citoplasma). La entrada de sodio a la célula provocará un aumento en la concentración de cargas positivas en la célula resultando en una disminución del potencial negativo dentro de la misma o en una inversión total del potencial hacia uno positivo. El ingreso de Na^+ se detendrá cuando el potencial electroquímico del ion este en equilibrio, en donde el flujo neto del ion es igual a cero (por eso se le llama también potencial de equilibrio o potencial de reversión), o cuando el canal debido a sus características (como una compuerta que bloqueé el curso de los iones a cierto voltaje, se desasocie el ligando del canal o el estímulo mecánico se detenga) se cierre. Al final, la célula regresará a su potencial antes de la apertura de los canales (potencial de membrana en reposo) utilizando varios mecanismos de extrusión de solutos (Bomba ATPasa, proteínas acarreadoras) o expulsión de cargas (Canales iónicos de K^+).

La interacción de estos mecanismos en los diferentes canales iónicos permite que la polaridad en la membrana cambie de manera rápida, estos cambios pueden propagarse a través de ella en forma de fenómenos denominados potenciales de acción que son la base de la transmisión de señales eléctricas en los tejidos excitables.

Dentro de la naturaleza existen canales iónicos que, a pesar de que se regulan bajo los mecanismos brevemente descritos arriba, no participan en la creación de potenciales de acción o en la modificación de la polaridad de la membrana, sino que ayudan a regular la homeostasis celular. Uno de ellos es el canal iónico permeable a protones Hv_1 , en el cual se centra este trabajo.

1.2 El canal iónico permeable a protones H_v1

1.2.1 Filogenia

Desde su descubrimiento y caracterización en el 2006 [9, 10], el H_v1 ha sido motivo de estudio relevante. Se ha logrado encontrar secuencias genéticas de esta proteína en un gran número de especies, desde organismos unicelulares como algas (género *Chlorella*), dinoflagelados (*Karlodinium veneficum*) diatomeas

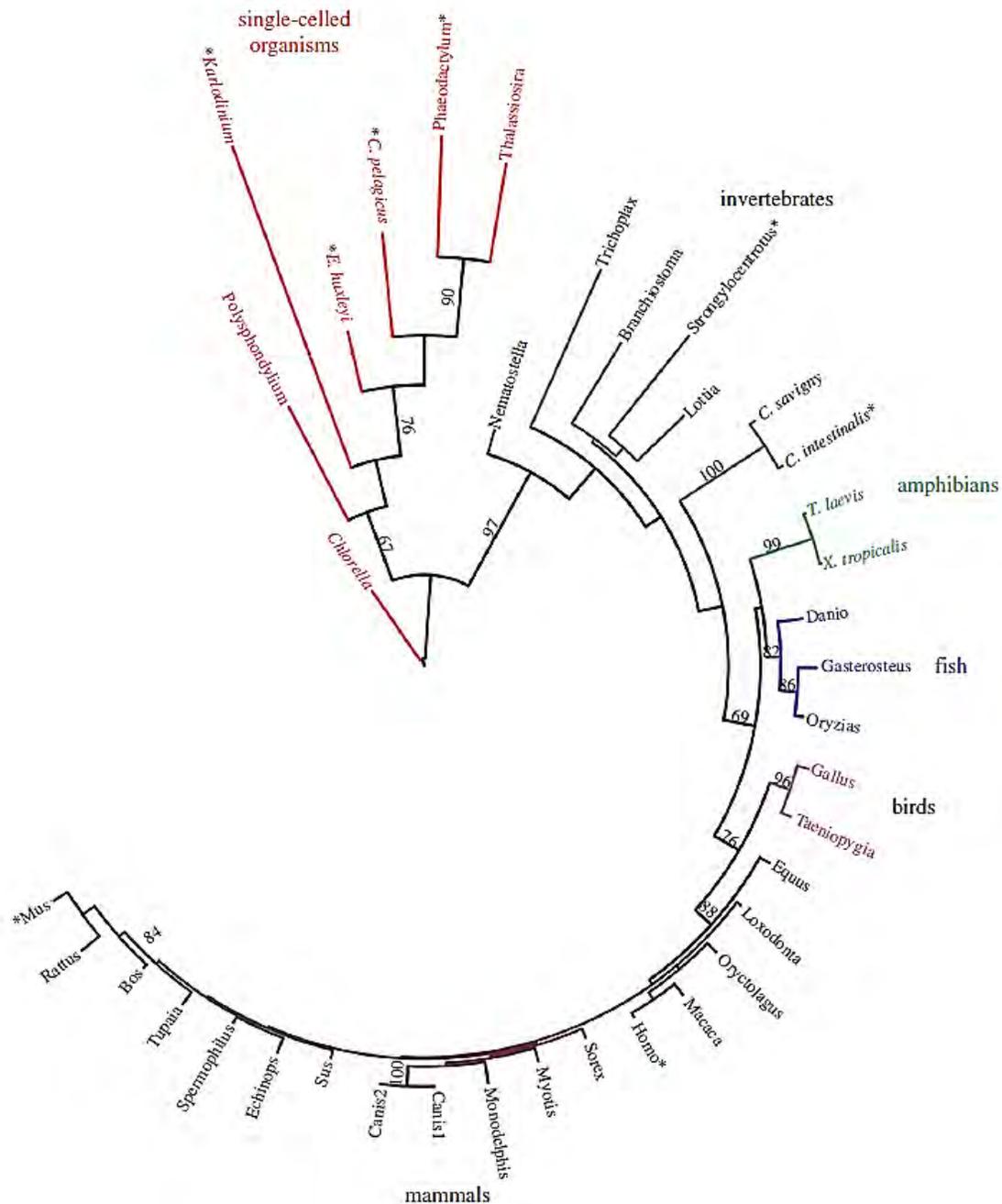


Figura 3. Análisis filogenético de 37 secuencias de H_v1. EL largo de los brazos es proporcional a la distancia entre secuencias. Son mostrados los valores de Bootstrap mayores a 60. Tomado de [1]

(*Phaeodactylum tricornutum*), y pluricelulares como invertebrados (*Ciona intestinalis*), anfibios (*Xenopus leavis*), peces (género *Danio*), aves (géneros *Gallus* y *Taeniopygia*) y mamíferos (géneros *Homo*, *Mus*, *Rattus*, *Canis*, *Macaca*, *Equus*, por mencionar algunos) (Figura 3)[1, 11].

1.2.2 Estructura

Conforme a su topología molecular, a diferencia de los canales iónicos para cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) que presentan 6 segmentos transmembranales (STM) -4 para formar el dominio sensor de voltaje (VSD) y 2 para formar la región de poro-, el canal Hv_1 está constituido por segmentos 4 segmentos transmembranales α -hélice (S1-S4) unidos por asas o linkers cortos y los dominios amino (N)-terminal y carboxilo (C)-terminal que son intracelulares (Figura 4 y 5) [6, 12, 13].

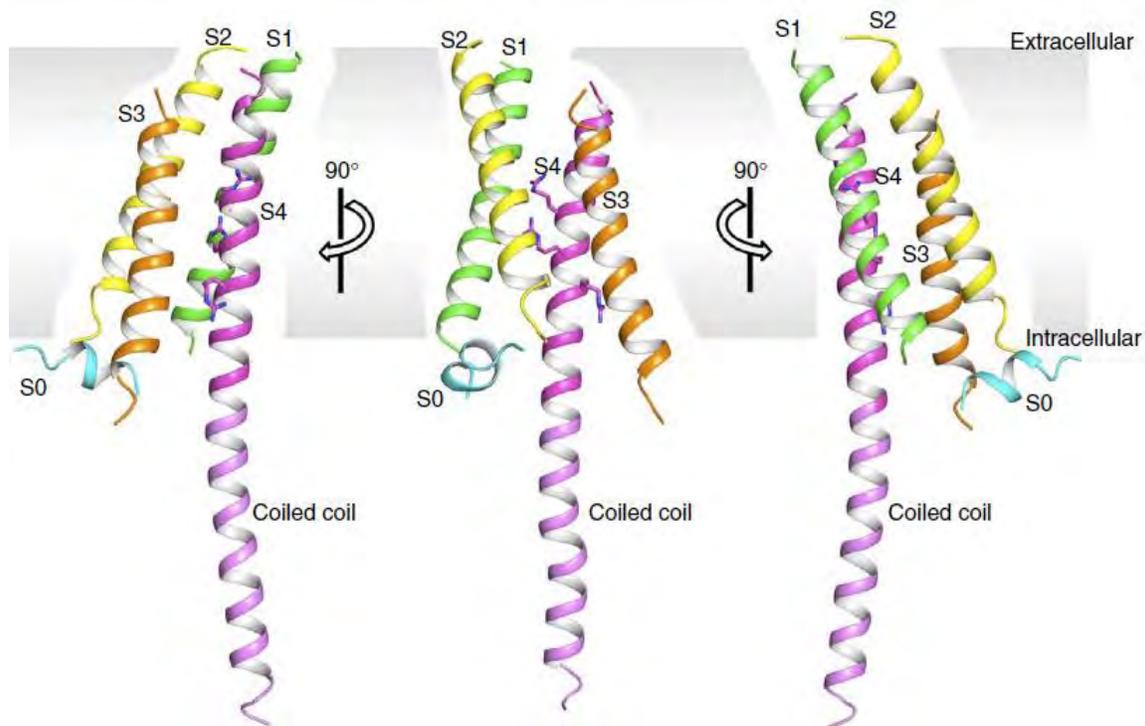


Figura 4. Modelo estructural de Hv_1 quimérico murino. Se muestran vistas a diferentes ángulos de los 4 STM en diferente color (S1 verde, S2 amarillo, S3 naranja, S4 rosa y C-terminal en rosa pálido. S0 corresponde a la hélice citoplasmática N-terminal. Tomado de [6].

Basados en el análisis de homología de secuencia, el Hv_1 está relacionado estrechamente con los VSD de las fosfatasa sensores de voltaje (VSP) (fig.5) y de las

proteínas c15orf27 (cromosoma 15 marco de lectura 27) de la cual aún no se conoce función. Estos grupos están relacionados por un ancestro común de los canales de Na^+ , Ca^{2+} y su vez estos se originaron de la familia de los canales de K^+ hace alrededor de mil millones de años [8].

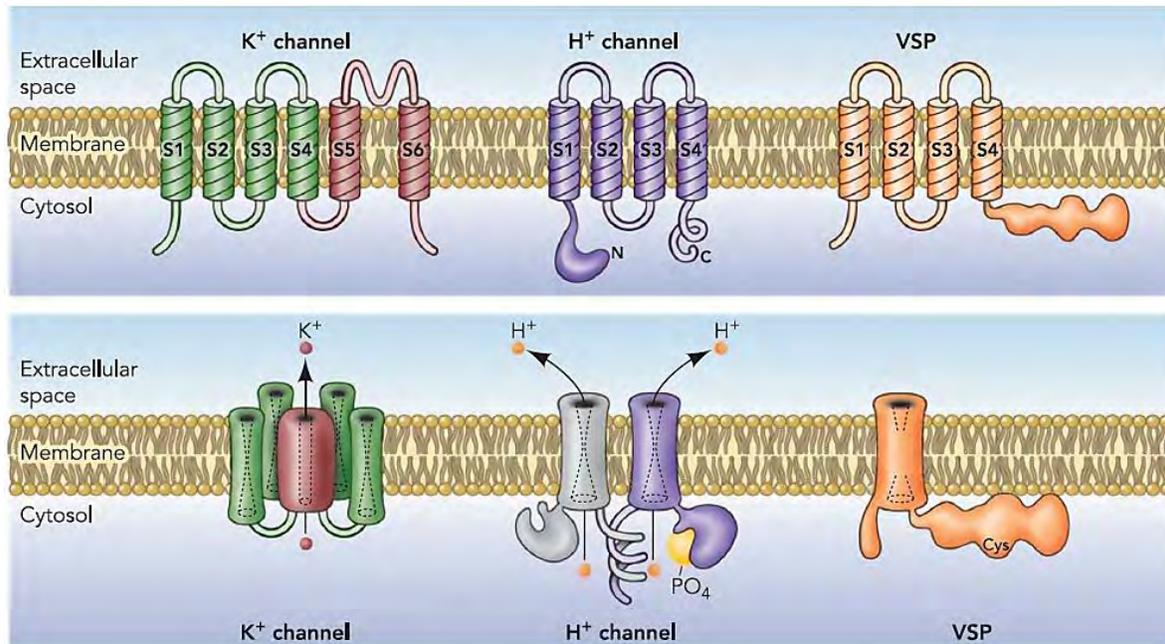


Figura 5. Características topológicas de los canales de K^+ , canales de H^+ y VSP. Arriba se muestra la constitución de los monómeros y abajo la presentación oligomérica de los canales. Nótese la presencia de la permeabilidad propia de cada monómero y la dimerización por la unión de C-terminal. Tomado de [1]

En los vertebrados y algunos invertebrados (*Ciona intestinalis*) el canal aparece formando homodímeros, esto debido a que las regiones C terminales de los respectivos canales Hv_1 forman una estructura superenrollada α -helicoidal [9]. En organismos más primitivos (dinoflagelados y diatomeas) no existe esa capacidad de la región C terminal y por lo tanto se piensa que el canal actúa monoméricamente en estos seres vivos [5]. Se ha estudiado la capacidad de dimerización del canal y sus repercusiones electrofisiológicas, que al parecer conllevan a una cooperatividad entre los dos VSD en la dependencia del voltaje que se discutirá más adelante [14, 15]. En cambio, la funcionalidad de las regiones N-terminal en el Hv_1 aún no se ha dilucidado del todo, pero al parecer la escisión de esta porción aumenta la activación del canal en células B malignas por un proceso de fosforilación que aumenta la activación del canal [16-18].

1.2.3 Características Electrofisiológicas

El canal Hv_1 cuenta con propiedades electrofisiológicas únicas que se han elucidado por los estudios con la técnica de fijación de voltaje [1, 19-21]. Estas pueden enumerarse de la siguiente manera:

1.2.3.1 Selectividad exclusiva a protones. En los canales iónicos canónicos, se ha observado que hay una gran selectividad, más esta no es absoluta [22]. Por ejemplo la permeabilidad (facilidad con la que un ion particular cruza la membrana) del potasio en canales de sodio es del 5 al 10%, sin embargo la bomba Na^+/K^+ ATPasa se encarga de reducir el impacto que podría tener el paso erróneo de potasio por el canal de sodio. El Hv_1 , por otra parte, debe de ser varios órdenes de magnitud más selectivo para alcanzar un correcto funcionamiento debido a que las concentraciones de protones en medios celulares (aproximadamente $pH=7$ o 10^{-7} M) son cerca de un millón de veces más pequeñas que otros iones (K^+ y Na^+) [1, 5, 20]. Experimentalmente la selectividad perfecta hacia los protones se ha probado mediante el remplazo de cationes o aniones en el baño de registro, lo cual no cambian el potencial de reversión (V_{rev}) [20]. Además, la reducción de la fuerza iónica cerca del 90% en las soluciones del baño que tampoco cambian el V_{rev} que solamente es modificado por un cambio en la concentración de H^+ y OH^- [20, 23].

La razón por la cual el canal Hv_1 tenga ese nivel de selectividad, se debe principalmente a la combinación de dos características. La primera de ellas es la capacidad del protón de moverse a través de las moléculas de agua en un proceso llamado mecanismo Grotthuss (Figura 6) [1, 20, 24]. Este mecanismo es producido por el movimiento saltatorio del H^+ dentro de moléculas de agua (H_2O) formando moléculas de hidronio (H_3O^+). El hidronio se encuentra embebido en una esfera de hidratación con la cual forma puentes de hidrogeno, lo que se llama catión Eigen ($H_9O_4^+$). Este catión se mantiene en equilibrio

hasta que en algún momento se forma un par, llamado catión Zundel ($H_5O_2^+$), debido a la geometría alcanzada por el hidronio y una molécula de agua que permite eventualmente la transferencia del protón. Esto puede iniciar la transferencia por cadenas de agua de dicho protón a una velocidad mucho más alta que cualquier otro catión. La segunda característica importante es la capacidad del canal de formar una cadena de transferencia de protones (CTP) a través de su estructura. Sin embargo el estudio de la misma no ha sido fácil, ya que una cristalografía directa del canal no ha sido posible, lo

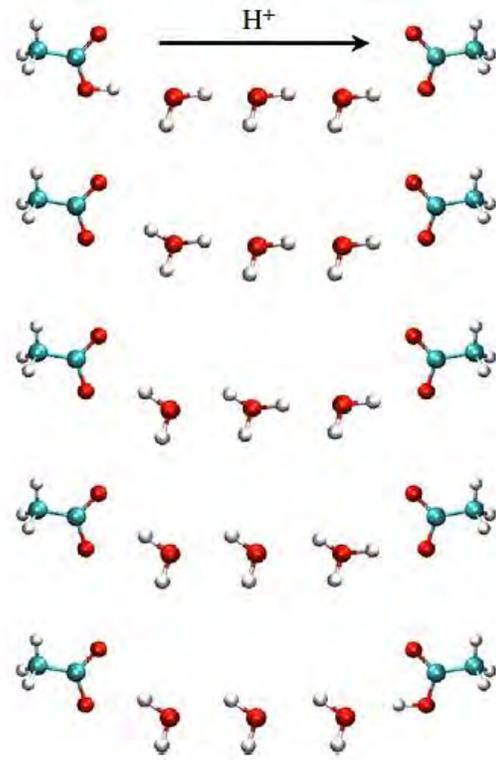


Figura 6. Esquema del mecanismo de transferencia saltatoria de protones Grotthuss en una cadena de agua desde un carboxilo. Hidrogeno en blanco, oxígeno en rojo y carbono en azul. Modificado de [5]

más cercano viene de una quimera de $Hv1$ de ratón, VSP de *Ciona intestinalis* y C-terminal de *Saccharomyces cerevisiae* [6]. Por lo tanto se ha recurrido al modelado computacional [11, 13, 25] y a la mutación del VSD para terminar de elucidar que parte de la proteína le brinda la selectividad [26]. Los resultados de esos experimentos muestran que el interior del canal es de la forma de un reloj de arena con dos regiones hidrofóbicas [6, 11, 13] que en su parte más estrecha se encuentran en interacción de un residuo de Aspartato ($D112$) y uno de Arginina ($R208$) [17, 23]. Se ha estimado que estos residuos componen un puente de sal formando una especie de andamio que solo puede ser separado por el ataque de un hidronio lo que conlleva a la creación de una cadena por la cual se puede desarrollar un mecanismo de Grotthuss [15, 22] (Figura 7). Sin embargo esta hipótesis necesita cambios conformacionales por parte del S_4

más pequeños a comparación de los S4 de otro tipo de canales iónicos activados por voltaje los cuales no se han confirmado experimentalmente [2, 21].

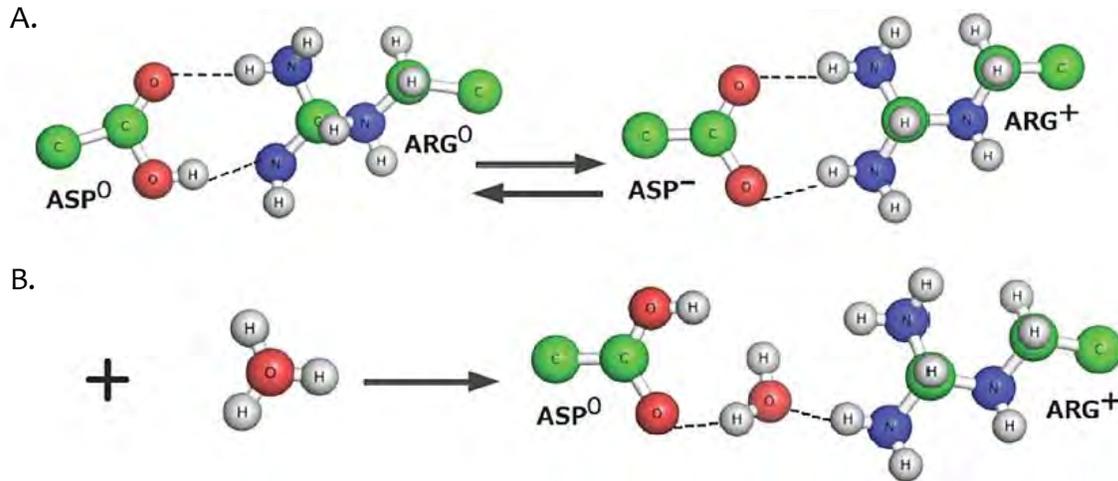


Figura 7. Modelo de selectividad propuesto en donde el Aspartato (Asp) y la Arginina (Arg) interactúan en el filtro de selectividad mediante dos puentes de hidrogeno representados con líneas punteadas, en configuraciones estables tanto el ASP como el ARG pueden estar protonados. La selectividad ocurre cuando únicamente un hidronio (H_3O^+) es capaz de romper la conexión Asp-Arg protonando a Asp y dejando una molécula de agua entre ellos permitiendo la aparición de un mecanismo de Grotthuss que atraviesa el poro. Modificado de [1, 2]

1.2.3.2 La dependencia de voltaje por el ΔpH . Como muchos canales iónicos, el H_{V1} se abre a potenciales relativamente positivos en condiciones naturales. Sin embargo, a diferencia de algunos canales catiónicos en el que la voltaje-dependencia de la activación del canal es a un potencial fijo u obedece a la concentración del ion en un determinado lado de la membrana [27], el efecto del pH sobre la activación del canal H_{V1} ocurre en ambos lados de la membrana. Por lo tanto la activación de los canales H_{V1} está regulada determinantemente por el gradiente de pH ($pH_e - pH_i = \Delta pH$) (Figura 8) [28, 29]. Esto tiene una importante ventaja biológica, ya que entre más aumenta el ΔpH , el potencial de umbral ($V_{\text{threshold}} = V_t$) que depende del V_{rev} disminuye lo que se traduce en que se volverá más fácil la activación del H_{V1} cuando se acumule ácido intracelular o disminuya extracelularmente. Como es más fácil que aumente el ácido intracelular, los H_{V1} únicamente abren cuando existe un gradiente electroquímico de salida para el H^+ expulsando ácido de la célula e

hiperpolarizando la membrana. Esto biológicamente es importante para la célula ya que le permite tener una vía de extrusión de la acidez producida por el metabolismo. Existe hasta el momento una excepción que es el caso de los dinoflagelados, en donde el canal de protones produce una corriente de entrada que sirve de disparador para las reacciones que llevan a la bioluminiscencia de estos organismos [30].

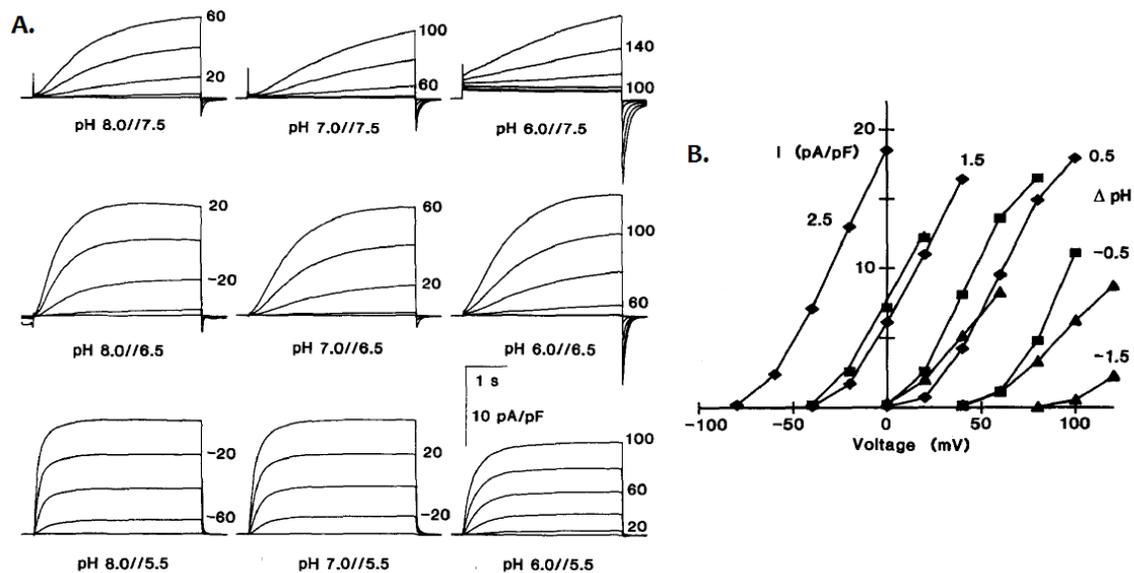


Figura 8. A. familias de corrientes de protones obtenidas en epitelio alveolar a diferentes pHs indicados como pH externo//pH interno. Pulsos en aumentos de 20mV y duración de 4 s. Las corrientes máximas de estas familias fueron graficadas en B, con diamantes para pH_i 5.5, cuadrados para pH_i 6.5 y triángulos para pH_i 7.5. Los números a un lado de las gráficas es el valor de Δ pH. Nótese como la voltaje dependencia apertura del canal es determinada por este gradiente. Modificado de referencia 26.

1.2.3.3 Efecto de la dimerización. Como se mencionó arriba, en varias especies (mayormente mamíferos) el canal se expresa en homodímeros, los cuales están unidos por la formación de una estructura α -helicoidal enrollada formada por los segmentos C-terminal de ambos monómeros [12, 31]. En cambio, en organismos unicelulares se ha descrito la falta de esta estructura y la acción del canal en su forma monomérica. Al momento de estudiar ambas conformaciones del canal H_{v1}, se desentrañaron algunas diferencias [15, 32]. Por ejemplo, los canales monoméricos se abren de 3-7 veces más rápido que su contraparte dimérica y su relación G_H-V es 10-15mV más positiva. Sin embargo

la diferencia más relevante se encuentra en la cinética de activación, donde se ha encontrado que en los dímeros la activación de uno facilita 60 veces la activación del otro monómero, derivando en el hecho de que en ambos monómeros se encuentren activados o desactivados al mismo tiempo, propiciando un estado de cooperatividad [33]. Una consecuencia de esa organización es que el Hv1 dimérico es dos veces más dependiente de voltaje que la forma monomérica. Aún no se sabe experimentalmente si la presencia de cooperatividad tiene alguna ventaja evolutiva, pero se sugiere que al ser más sensible al voltaje las células podrán regular de manera más exquisita su actividad [5, 15, 34].

1.2.3.4 Inhibición. Se ha descrito una sensibilidad limitada al catión divalente Zn^{2+} que se une competitivamente a los residuos de histidina His-104 y His193 que se encuentran en la región extracelular del canal y previenen la apertura del Hv1 [35, 36] (Figura 9).

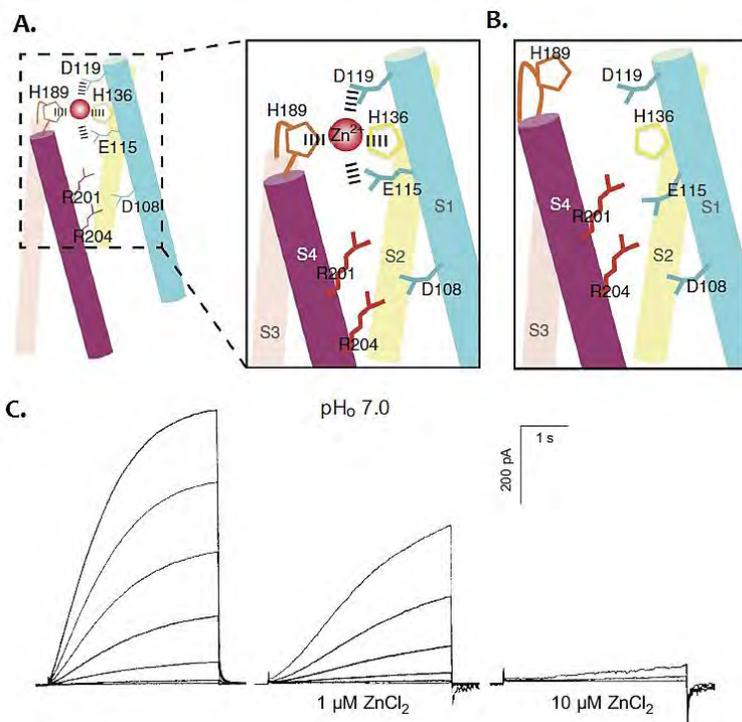


Figura 9. Esquema del mecanismo propuesto para la inhibición por Zn^{2+} en el canal Hv1 de ratón. (A) se muestra las relaciones del catión (rojo) por líneas intermitentes a los residuos de Histidina 189, histidina 136, glutámico 115 y Aspartato 119 en un sitio de unión externo. (B) propuesta del estado activado del mismo canal. [Referencia 2]. (C) efectos inhibitorios del Zn^{2+} en epitelio alveolar a diferentes concentraciones (1 μM y 10 μM). Familias de corrientes realizadas en voltaje clamp, pulsos con incrementos de 10mV. Modificado de 1 y 6.

1.2.4 Funciones Biológicas

La función del H_{v1} dentro de los tejidos es muy variada y especializada. Se ha tratado de categorizar su función dentro de los organismos dentro de 4 órdenes principales:

1.2.4.1 Regulación del potencial de la membrana o compensación de cargas.

En el fenómeno de estallido respiratorio en los fagocitos, la célula expulsa cargas negativas en forma del anión superóxido producido por la NADPH oxidasa, lo que podría cambiar el potencial de la membrana. Entonces la actividad del H_{v1} expulsa ácido de la célula y compensa la carga. Esta función ha sido propuesta para varios tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, osteoclastos, basófilos, microglía, espermatozoides, linfocitos, células dendríticas y fibroblastos cardiacos [1, 17, 19, 28, 37-41]. También se ha sugerido la función en el dinoflagelado *Karlodinium veneficum* donde el canal produce el potencial de acción de H⁺ que inicia las reacciones bioluminiscencia como ya se comentó [30].

1.2.4.2 Regulación del pH interno (pHi). Esta función es una acción conjunta a la anterior y ocurre en todos los organismos donde se ha estudiado el H_{v1}, sin embargo, tiene repercusiones directas en la capacitación de los espermatozoides, maduración de ovocitos en anfibios, células mamarias malignizadas, basófilos durante la secreción de histamina, neutrófilos y eosinófilos durante la fagocitosis y en la calcificación de cocolitóforos.

1.2.4.3 Regulación de pH externo (pHe). Esta función es importante en la fisiología normal alveolar en seres humanos y en la fisiopatología de la invasividad del cáncer mamario [18, 39].

1.2.4.4 Regulación de gradiente osmótico. Se ha estudiado que éste fenómeno está envuelto en la actividad fisiológica de la microglía y en fagosomas [22, 42, 43].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se han terminado de comprender en su totalidad los mecanismos que regulan la dependencia del ΔpH en el voltaje de activación, los movimientos de activación de los VSD ni los involucrados con la selectividad a los protones, por lo que debe de ser objeto de intenso estudio las relaciones que pueden tener estas funciones con la estructura del canal que lleven al conocimiento integral de la proteína.

Por estas razones, parece necesario el empleo de diferentes metodologías para tratar de comprender la estequiometría y estructura de los componentes moleculares del canal. Uno de estos métodos es la espectroscopia de fluorescencia, que, gracias a un fenómeno llamado transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET, por sus siglas en inglés), permite estimar la distancia entre dos moléculas fluorescentes. Éste proceso consiste en la transferencia de energía de una molécula donadora a otra aceptora a través de un proceso no radiativo. El FRET es un proceso que depende de la distancia y su eficiencia es proporcional al inverso de la sexta potencia de la separación entre las dos moléculas, el rango de distancias en las cuales ocurre este fenómeno son típicas de dimensiones de las moléculas biológicas, permitiendo que el FRET sea utilizado como una “regla” molecular para estimar distancias entre dominios proteínicos tanto intracelulares como membranales[44-46].

3. HIPÓTESIS

Si una proteína fluorescente se fusiona al extremo C terminal del segmento S₄ del canal H_{v1} sin afectar su función, esta servirá para detectar el movimiento perpendicular al plano de la membrana de dicho segmento producido por voltajes despolarizantes, mediante el intercambio de energía (FRET) con un aceptor colocado en la membrana.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de cambios conformacionales medibles por espectroscopía de fluorescencia en función de la activación del canal H_{v1} a diferentes voltajes y valores de pH.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir proteínas de fusión entre el canal H_{v1} y proteínas fluorescentes Venus y tagRFP.
- Determinar el movimiento relativo del segmento transmembranal S_4 dependiente de la activación del canal H_{v1} a partir del monitoreo de los cambios de la eficiencia de FRET.
- Determinar el movimiento perpendicular con respecto de la membrana de los dominios N- y C- terminales del canal H_{v1} , relacionado con su activación por voltaje y a diferentes pH, midiendo cambios de la eficiencia de FRET.
- Determinar la anisotropía de las proteínas fluorescentes unidas en los dominios terminales del canal H_{v1} dependiendo el sitio de unión (N-terminal, C-Terminal y Δ -C).

5. METODOLOGÍA

5.1 Biología Molecular. Se trabajó a partir de un canal de protones de la especie humana (hHv1) unido por el extremo amino terminal a la proteína fluorescente Venus [9, 47]. A partir de dicho vector, se amplificaron las secuencias del Hv1 y Venus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 10). Después, utilizando una técnica basada en la PCR (“PCR overlap”), se construyeron las proteínas de fusión Hv1-Venus y Hv1ΔC-Venus (En esta construcción se usó un oligonucleótido que trunca al canal desde su aminoácido 221, eliminando el coiled-coil del canal original), insertando un linker de 4 glicinas (GGGG) entre las dos proteínas así como un sitio de restricción diferente en cada extremo (BamHI para el N-terminal y EcoRI en el C-terminal) para ser insertados en el plásmido pMax a través de una subclonación (Figura 11).

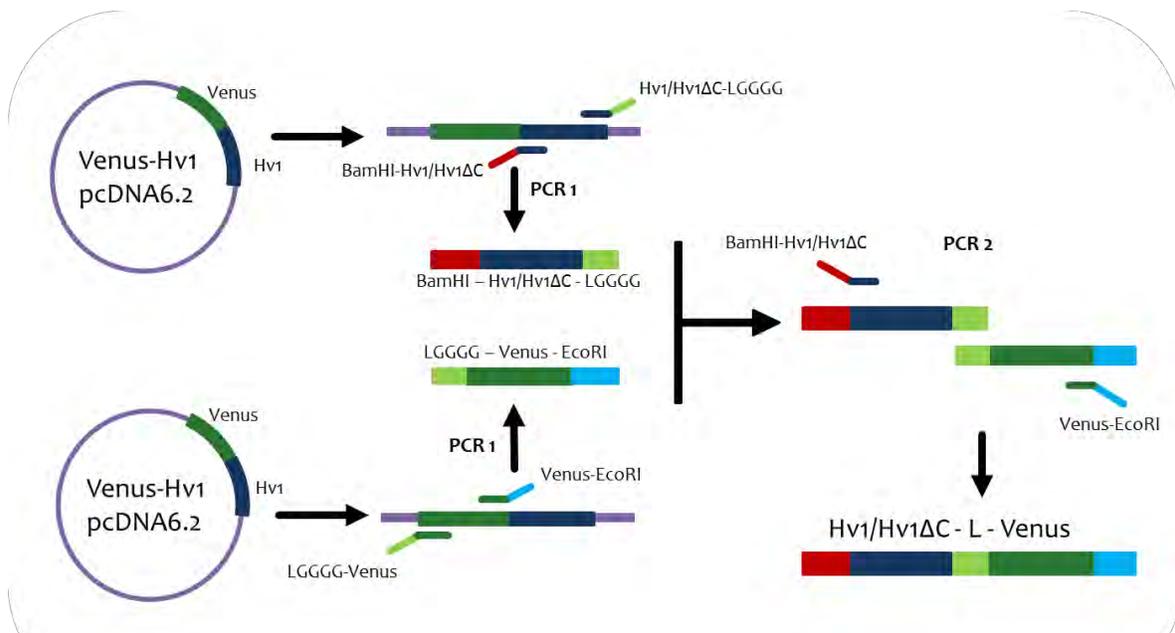


Figura 10. Esquema de la creación de las construcciones de las proteínas de fusión a partir de los vectores donados al laboratorio usando la técnica “PCR overlap”. El primer proceso de PCR tendrá como resultado la secuencia del canal (ya sea Hv1 o Hv1ΔC) [azul marino] junto al linker de 4 glicinas [verde claro] y el sitio de restricción BamHI [rojo], y la secuencia de la proteína venus [verde oscuro] rodeado de las secuencias del linker de 4 glicinas y del sitio de restricción EcoRI [azul claro]. En el segundo proceso de PCR se combinan los fragmentos obtenidos de la primera reaccionando con los oligonucleótidos que tienen la secuencia del sitio BamHI unido a la secuencia del canal y la secuencia de Venus con el sitio de restricción EcoRI. El resultado de la segunda PCR es el fragmento que se subclonará al vector pMax, que contiene la proteína Venus en la porción C-terminal del canal.

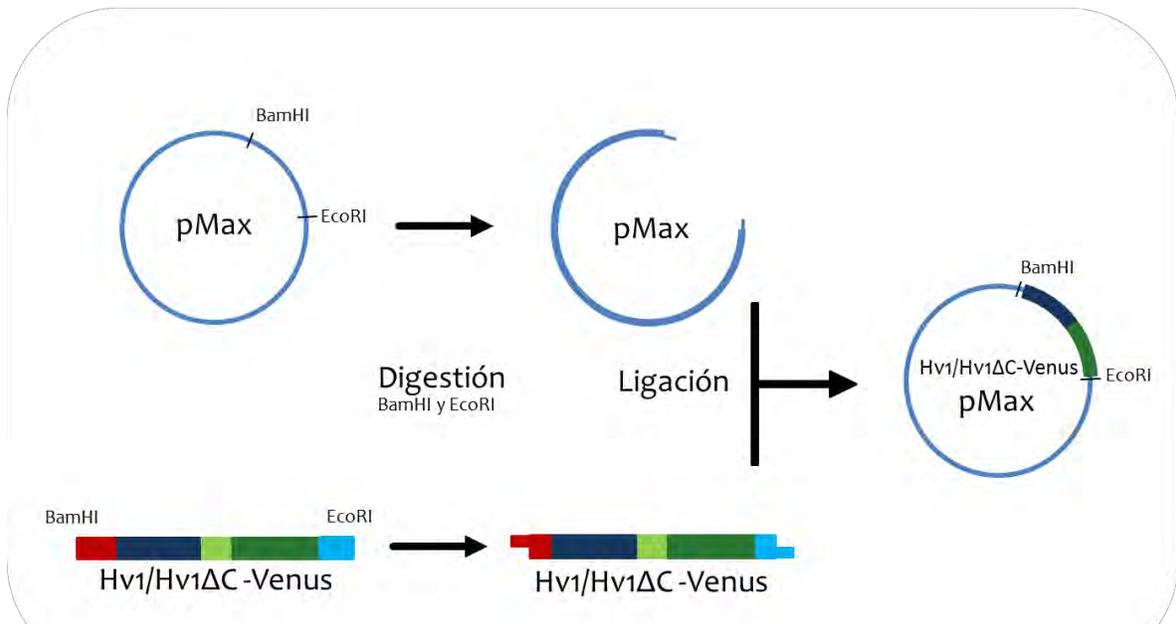


Figura 11. Esquema de la subclonación de la construcción que tiene el canal (ya sea Hv1 o Hv1ΔC) unido al C-terminal a la proteína fluorescente Venus. En un primer paso se realiza una digestión con las enzimas BamHI y EcoRI al vector pMax y al producto de la “PCR overlap” anterior para crear fragmentos con terminaciones adherentes que serán unidos en una segunda reacción de ligación de secuencias para obtener el plásmido Hv1/Hv1ΔC-Venus pMax que será utilizado para la síntesis de RNA.

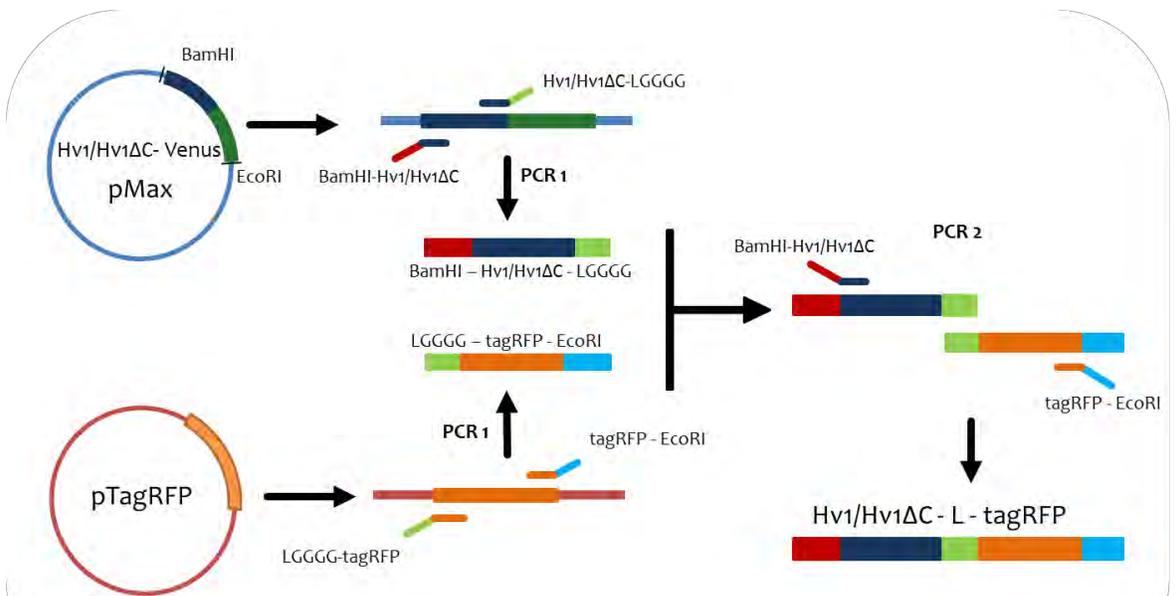


Figura 12. Esquema de la creación de la proteína de fusión que tiene el canal (ya sea Hv1 o Hv1ΔC) unido al C-terminal a la proteína fluorescente tagRFP. En un primer paso se realiza una PCR “overlap” para obtener la secuencia del canal iónico [azul marino] y de la tag-RFP [naranja] de sus respectivos vectores unidos a las secuencias de restricción BamHI [rojo] y EcoRI [azul claro]. En una segunda PCR, se combinan los productos del primer paso junto con los oligonucleótidos BamHI- Hv1/Hv1ΔC y tagRFP-EcoRI para obtener la secuencia de la proteína fluorescente unida al C-terminal del canal iónico con un linker de 4 glicinas [verde claro] que se subclonará a pMax.

Se obtuvo la proteína tagRFP del vector comercial pTagRFP-C (Evrogen) y se fusionó con el canal H_{v1} y al H_{v1}ΔC usando de nueva cuenta el método PCR-overlap (Figura 12), colocando los sitios de restricción arriba mencionados con la misma orientación (BamHI en N-terminal y EcoRI en el C-terminal). En seguida se realizó la digestión (enzimas de restricción de New England Biolabs) y se subclonó al vector pMax (Figura 13).

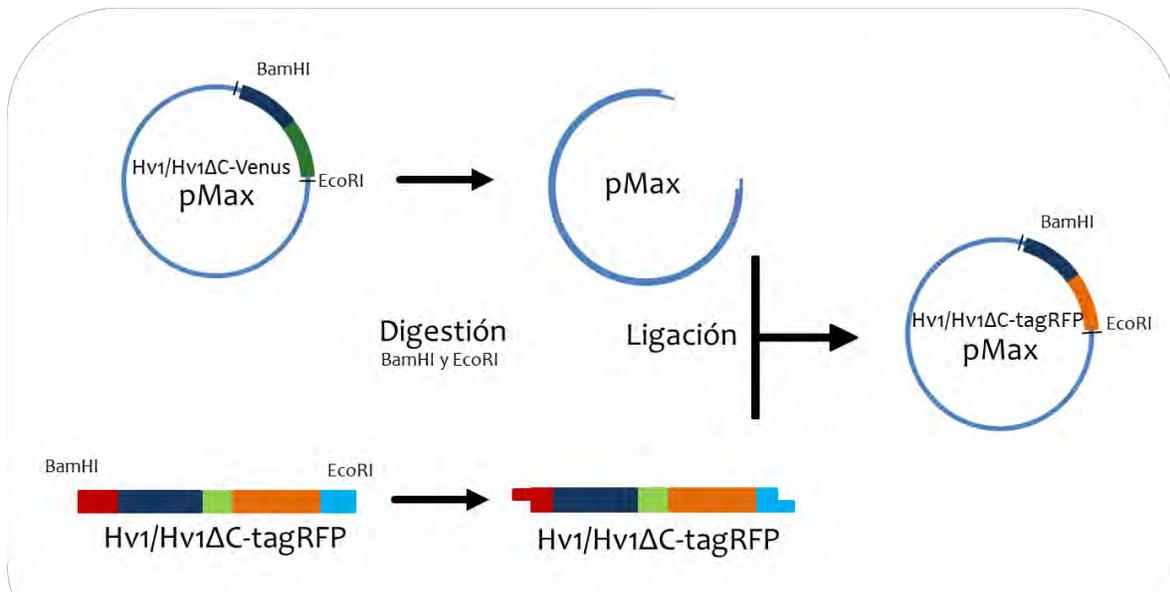


Figura 13. Esquema de la subclonación de la construcción que tiene el canal (ya sea H_{v1} o H_{v1}ΔC) unido al C-terminal a la proteína fluorescente tag-RFP. En un primer paso se realiza una digestión con las enzimas BamHI y EcoRI al vector pMax y al producto de la “PCR overlap” anterior para crear fragmentos con terminaciones adherentes que serán unidos en una segunda reacción de ligación de secuencias para obtener el plásmido H_{v1}/H_{v1}ΔC-tagRFP pMax que será utilizado para la creación de RNA.

Después de secuenciar el producto de las PCR, para asegurar la construcción íntegra de las nuevas secuencias de las proteínas de fusión, se realizó la síntesis de mRNA por transcripción *in vitro* empleando RNA polimerasa (mMessage mMachine T7/Ambion). Se purificaron los mRNA sintetizados con cloruro de litio y etanol, resuspendiéndose en agua libre de DNAsas para su expresión en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, quedando una concentración aproximada de 0.5 a 1 μg/μl.

Tabla 1. Descripción de las proteínas de fusión de los canales iónicos y las proteínas fluorescentes usadas en este trabajo

Proteína de fusión		Descripción
H _{V1} - Venus		Canal H _{V1} unido a Venus por el C-Terminal
H _{V1} ΔC - Venus		Canal H _{V1} truncado en el aa 221 unido a Venus por el C-Terminal
H _{V1} - tagRFP		Canal H _{V1} unido a tagRFP por el C-Terminal
H _{V1} ΔC - tagRFP		Canal H _{V1} truncado en el aa 221 unido a tagRFP por el C-Terminal

5.2 Expresión en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

Los ovocitos de este modelo biológico se obtuvieron estandarizando el protocolo descrito previamente en la literatura [48, 49]. A través de un procedimiento quirúrgico, en donde se realiza una incisión paramedial en la región inferior del abdomen de un espécimen femenino previamente anestesiado con una solución de triclaína al 0.22% (pH=7 ajustado con NaOH), se adquieren varios segmentos de ovario de la cavidad abdominal. La incisión es reparada a primera intención suturando el músculo con catgut crómico (calibre 3-0) y la piel con sutura nylon (calibre 3-0). La rana se recupera de la anestesia en un tanque con agua apartado previamente, procurando mantener las fosas nasales por encima del nivel del agua hasta que la rana haya dado datos de movimiento propio.

Los segmentos de ovario se separaron manualmente a fragmentos más pequeños y éstos se desfolicularon a través de un tratamiento con colagenasa tipo IA (clostridiopeptidasa A/Sigma-Aldrich) a una concentración de 1.2mg/ml en solución OR₂; que se compone de (en mM): 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, y 5 HEPES (ajustado a pH 7.5 con NaOH); manteniéndose en agitación en un tubo a 60 rpm. Luego de 30 minutos, la solución es reemplazada con solución OR₂ sin colagenasa y se agitan a las mismas revoluciones durante 30 minutos más. A continuación se cambia la solución por otra llamada ND 96 que contiene (en mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 20μg/mL gentamicina (pH 7.5 ajustado con NaOH) y se incuban

los recién procesados ovocitos a 18 °C. Para incrementar la supervivencia de los ovocitos, se suplementó la solución descrita con 5% suero bovino fetal (Gibco) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

Los ovocitos en estadios V y VI fueron elegidos para la inyección con mRNA de las proteínas de fusión. Seis horas después de su extracción utilizando un microinyector Nanostepper (Drummond Scientific) y pipetas de ~20 µm de diámetro de apertura, se inyectaron los ovocitos seleccionados con 40-50nL de mRNA. Ulteriormente, los ovocitos se conservaron en una incubadora a 18 °C. Los experimentos fueron realizados de 3 a 7 días después de la inyección.

5.3 Electrofisiología.

En este trabajo se analizó la función del canal mediante experimentos conocidos como “Patch Clamp Fluorometry”. Con esta técnica, desarrollada a inicios de la década pasada [50], se puede investigar cambios conformacionales en los canales iónicos a través de observar cambios en la fluorescencia de diversas sondas que están unidas a ellos y son sensibles a cambios en su ambiente, a cambios conformacionales de su estructura o de la estructura del canal al cuál están unidos. La unión de estos dos recursos, la electrofisiología y la fluorescencia, ha permitido un acercamiento al estudio de la estructura de los canales iónicos; sus posibles estados electrofisiológicamente velados (estados cerrado, inactivo y desensibilizado); y su ambiente local junto con sus moduladores intracelulares. En esta sección nos centraremos al componente electrofisiológico de dicha técnica.

El Patch-clamp o fijación de voltaje en microáreas de membrana es un procedimiento en el cual se registra la corriente que fluye a través de los canales iónicos que se expresan en una membrana. Éste método consiste en tomar pequeños fragmentos de la membrana de una célula con pipetas de vidrio, sin penetrar a la misma, adhiriendo la membrana a la pipeta con sellos de alta resistencia, de la magnitud de Gigaohms

regularmente. De allí se desprenden las diferentes modalidades en las cuales se pueden hacer los registros de corriente. La primera de ellas es cuando la célula se acaba de adherir a la pipeta de vidrio. Ésta configuración recibe por nombre “cell-attached” u “on-cell” y permite hacer registros con el medio interno de la célula intacto. De allí pueden derivar las demás modalidades. Si se realiza una ruptura a la porción de la membrana que se encuentra debajo de la salida de la pipeta sin romper el sello se logrará tener acceso al citoplasma y poder activar la totalidad de canales en la célula de estudio. Esta configuración se le conoce como “whole-cell”. Si, en vez de romper la membrana que se encuentra debajo de la salida de la pipeta, se separa con un movimiento rápido de la célula manteniendo la integridad del sello, se logra la modalidad “inside-out”, donde la porción intracelular de la membrana se expone al baño del experimento. Esto permite tener control sobre el ambiente en donde se desarrolla el parche, como la adhesión de un ligando intracelular o la concentración intracelular del ion permeante. Si, después de lograr la configuración “whole-cell”, se retira lentamente la pipeta, permitiendo que actúen las propiedades de los fosfolípidos que conforman la membrana, los residuos que quedan en la pipeta se unen formando

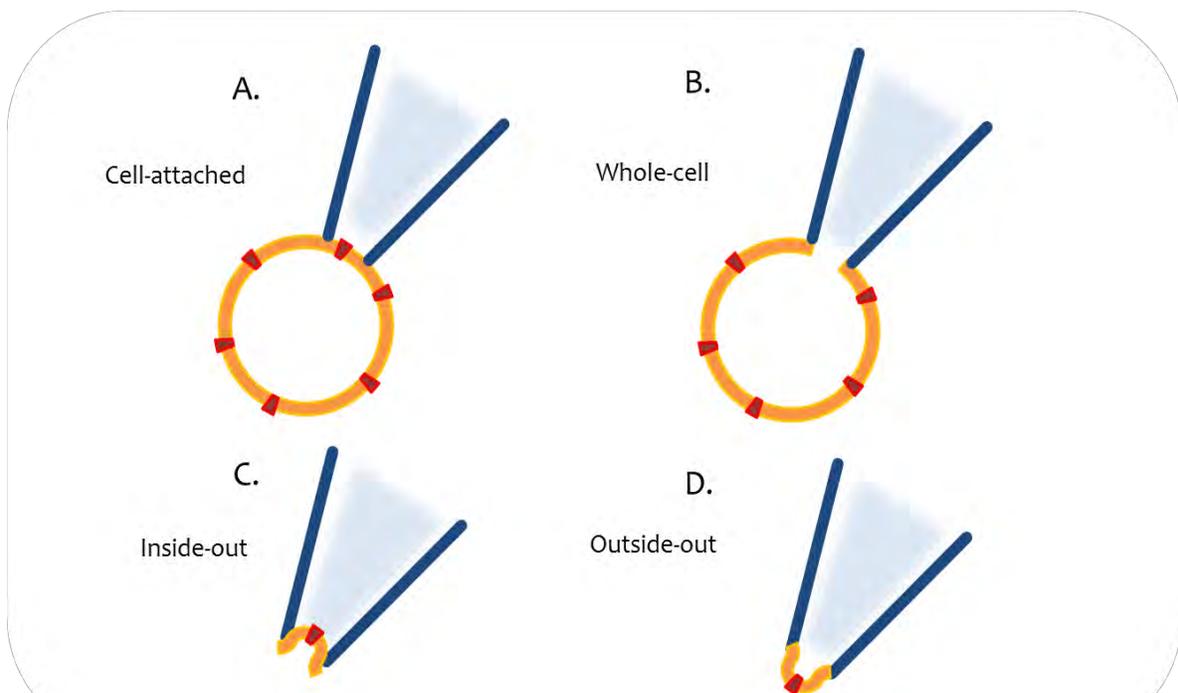


Figura 14. Representación de las diferentes configuraciones de la técnica de Patch-clamp. En amarillo se representa la membrana celular, en rojo el canal iónico y en azul la pipeta. La descripción de la técnica se encuentra en el texto.

un sello donde la porción externa de la membrana queda expuesta al baño del experimento. Dicha modalidad tiene por nombre “outside-out” y es útil cuando se tiene la intención de estudiar los efectos de ligandos externos con la activación y la corriente del canal (Figura 14).

5.4 Adquisición de Datos.

Para las mediciones de corriente de H⁺ en la membrana de los ovocitos se usó la técnica de Patch-clamp en la modalidad “inside-out”, que se obtuvo realizando un giga sello, usando pipetas de vidrio de borosilicato (Warner Instruments) cuyas puntas se pulieron con una microforja MF-830 (Narishige). La resistencia de las pipetas en la solución de registro fue entre 0.6 y 1.5 MΩ. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente del laboratorio, entre 21 y 23 °C. Las soluciones de registro en los experimentos se resumen en la tabla 2. Como fue necesario realizar los registros a diferentes concentraciones de hidrogeniones, se utilizaron diferentes buffers para controlar el pH de las distintas soluciones: HEPES (pH 7) y MES (pH 5-6.5). Los diferentes pH se ajustaron con N-metil-D-Glucamina (NMDG) o con HCl. En la solución de baño se colocó además Dipicrylamida a 20 μM (DPA) que es un buen par FRET para la proteína Venus y se calculó que podría serlo con la tagRFP. La elección de estas proteínas fluorescentes se tocará más adelante.

Tabla 2. Descripción y resumen de las soluciones usadas en este trabajo

Construcciones	H _{v1} ΔC-Venus	H _{v1} -Venus	H _{v1} -tagRFP
Componentes	1 mM EGTA 2 mM MgCl ₂ 5 mM KCl 10 mM HEPES 130 mM Aspartato	1 mM EGTA 2 mM MgCl ₂ 5 mM KCl 10 mM HEPES 150 mM Aspartato	1 mM EGTA 2 mM MgCl ₂ 5 mM KCl 10 mM Buffer ▪ MES ▪ HEPES 150 mM Aspartato

Una vez obtenida la configuración deseada, se mantiene el voltaje transmembranal y se miden las corrientes en respuesta a los cambios del voltaje. Los experimentos se llevaron a cabo a pH simétrico de 7 ($\Delta\text{pH}=0$) para los parches que tenían Venus y con pH 5 en el baño y pH 7 en la pipeta para los parches con tag-RFP ($\Delta\text{pH}=2$). Los registros se realizaron a temperatura ambiente (22 - 25 °C). Las corrientes fueron registradas usando un amplificador Axopatch 200b (Axon), las corrientes macroscópicas se adquirieron a 10 kHz y se filtraron a 5 kHz. Los datos se adquirieron con el programa Pulse y Patch Master (HEKA Elektronik GMBH). Las corrientes obtenidas se analizaron con el programa Igor Pro (Wavemetrics Inc).

Se usó un protocolo con un potencial de mantenimiento a -90mV. Las corrientes fueron activadas mediante familias de pulsos que consistían en un primer pulso de -100mV de duración de 1.2 s seguido de un segundo pulso variable que iba de -60 a 160mV (en aumentos de 20mV) de 1.2 s de duración, finalmente se regresaba al potencial de mantenimiento durante 300 ms. Para los experimentos de los parches con tag-RFP, el segundo pulso va de -100 a +120mV. Por la amplitud de los pulsos no se aplicó la substracción de componentes de corriente lineales. Se consideraron para al análisis de corriente solamente los parches que superaran una corriente de 50pA en el pulso prueba de 100mV (Figura 15).

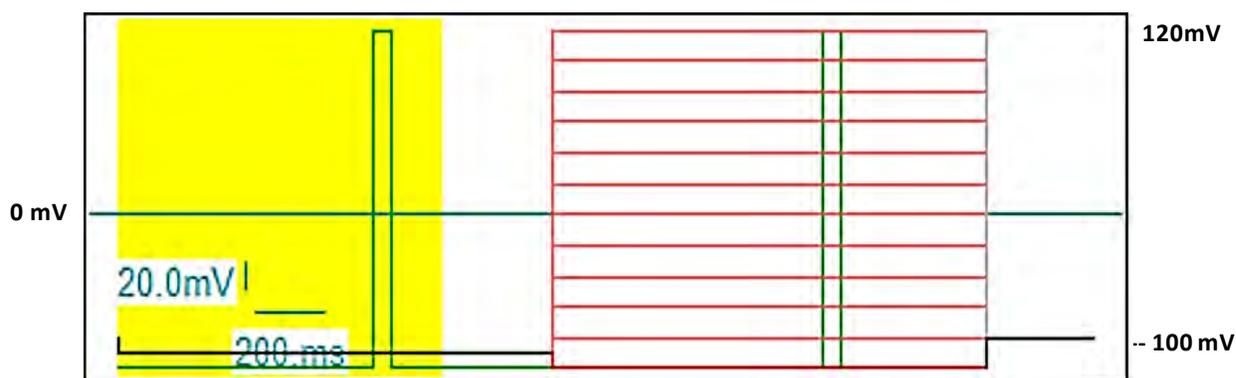


Figura 15. Esquema del protocolo utilizado en los parches con la proteína de fusión Hv1- Venus y Hv1-tagRFP. La línea azul representa 0mV, los incrementos de voltaje en la familia de pulsos se representa en líneas rojas continuas. Las líneas de color verde representan los momentos en que fueron tomadas las fotos. La región en amarillo no se registró en las corrientes.

El cálculo de la conductancia (G_H) se realizó conforme a la ecuación de Ohm:

$$G_H = \frac{I_H}{V_{\text{test}} - V_{\text{rev}}} \quad (\text{Eq.1})$$

Donde V_{test} es el pulso prueba, I_H son las corrientes de voltaje al pulso prueba, V_{rev} es el potencial de reversión que se obtuvo a través la ecuación de Nernst para el ion H^+ . Los datos obtenidos de la conductancia fueron ajustados siguiendo la ecuación de Boltzmann,

$$G_H(V) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-z(V - V_{0.5})}{k_B T}\right)} \quad (\text{Eq.2})$$

Donde z es la carga aparente asociada (en unidades de e_0); G_H es la conductancia máxima; $V_{0.5}$ es el voltaje medio de máxima activación y k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura en grados Kelvin.

5.4 Fluorescencia.

5.4.1 Bases teóricas de FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET por sus siglas en inglés) es un fenómeno físico en el cual una molécula fluorescente donadora previamente excitada le concede energía a una molécula aceptora a través de un proceso que no involucra fluorescencia (o no radiativo)[45, 51, 52]. La transferencia de energía es el resultado de interacciones dipolo-dipolo entre la molécula donadora y la aceptora. Para que este fenómeno pueda ocurrir es necesario que se cumplan ciertas condiciones. La primera de todas ellas es que el espectro de emisión del donador se sobrelape con el espectro de absorción del aceptor ya que la excitación de este último se acopla con la relajación no radiativa del primero permitiendo el traspaso de energía. La segunda es la orientación relativa entre los dipolos de transición del donador y del

aceptor. Entre más perpendicular la alineación, las oscilaciones de resonancia se cancelan entre las moléculas y existe menos transferencia energética. La tercera recae en el rendimiento cuántico del donador. Y la cuarta condición es la distancia entre el donador y el acepto. Ésta última es de suma importancia porque, como el fenómeno depende de la distancia, se puede correlacionar la eficiencia de la transferencia de energía obtenida de manera experimental y poder estimar de manera precisa la distancia entre las dos moléculas, utilizando el FRET como una “regla molecular”.

La energía acarreada se emitirá a través de la liberación de un fotón que tendrá la longitud de onda del espectro de emisión del acepto si dicha molécula es un fluoróforo. Cabe mencionar que el fenómeno puede suceder sin la necesidad de que la molécula aceptora puede sea un fluoróforo, entonces, el FRET se valorará midiendo la intensidad de la fluorescencia relativa del donador, en ausencia y presencia del acepto.

La teoría que envuelve a este proceso de transferencia indica que la eficiencia del mismo varia como el inverso de la sexta potencia de la distancia entre dos moléculas:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (\text{Eq.3})$$

Donde r es la distancia que se encuentra entre el donador y el acepto, R_0 es la distancia en donde la eficiencia de la transferencia es del 50%, es decir, el 50% de las moléculas donadoras ceden su energía a una molécula aceptora. La elevación del cociente de la distancia (r) entre R_0 a la sexta potencia se traduce a que un pequeño cambio en la distancia, de la magnitud de Angstroms (\AA), resultará en un cambio evidente en la eficiencia del FRET. El valor de R_0 deriva de las propiedades espectroscópicas de cada una de las moléculas involucradas (par donador-acepto), del medio donde se localicen y de las características de la forma en cómo se relacionan, lo que se puede sintetizar en la siguiente ecuación:

$$R_0 = 0.211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad (\text{Eq.4})$$

Donde κ^2 es el factor que describe la orientación relativa entre los dipolos del donador y el aceptor en el espacio, n es el índice refractario del medio, Q_D representa el rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor y $J(\lambda)$ expresa el grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor.

El factor κ^2 se determina por:

$$\kappa^2 = (1 + 3\cos\theta)\cos\omega \quad (\text{Eq.5})$$

Donde θ es la posición angular del aceptor en relación con el vector del dipolo de emisión del donador y ω es la orientación de dipolo de absorción del aceptor con relación al campo eléctrico del donador. Es importante señalar que durante la realización de los experimentos de FRET, debido a que las moléculas donadoras como aceptoras se orientan de manera aleatoria (ya sea en una solución o unidos a cadenas flexibles de una molécula biológica), se ignora los valores exactos tanto de θ como ω , por lo tanto también el valor exacto de κ . Para poder enfrentar este dilema se asumen las orientaciones aleatorias mediante distribuciones de probabilidad. El valor promedio de un ángulo polar es de $1/3$ y como ambos ángulos (θ y ω) son independientes el valor promedio de κ se estima como $2/3$ [51, 53].

El solapamiento de los espectros definido como $J(\lambda)$ es una integral que se definen con la siguiente ecuación:

$$(\text{Eq.6})$$

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D \lambda \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Donde F_D es la intensidad de fluorescencia del donador bajo el rango de λ con el total de la intensidad (área bajo la curva) normalizada a la unidad y ε_A es el coeficiente de extinción molar del aceptor en λ .

Si bien lo anteriormente expuesto es lo que se ha descrito para un par donador-aceptor, debemos tener en cuenta que los experimentos realizados en este trabajo involucran una configuración más compleja, en donde el donador cede su energía a un número múltiple de aceptores. La molécula que fungió como aceptor para ambas proteínas fluorescentes (Venus y tagRFP) fue la Dipicrilamida (DPA)[54, 55]. Ésta molécula es hidrofóbica y está cargada negativamente, lo que le permite intercalarse entre las moléculas que conforman la membrana lipídica y moverse por el espesor de

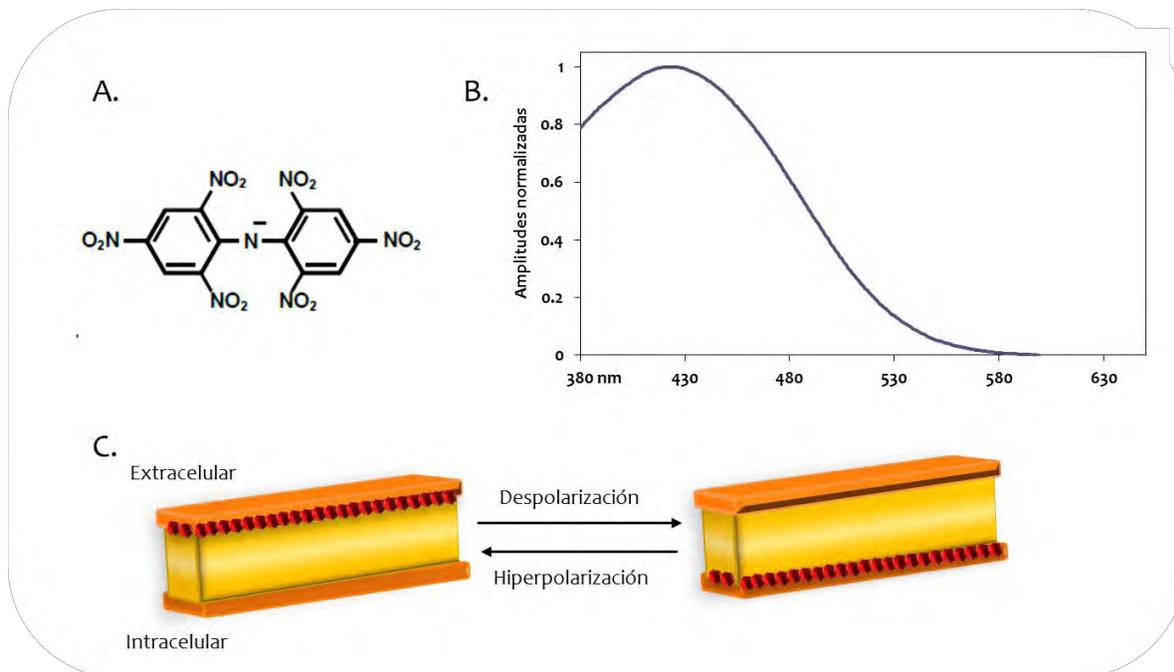


Figura 16. Características de la molécula DPA. A. Estructura. B. Espectro de absorción normalizado. C. Esquema que representa el movimiento de la molécula a través del espesor de la membrana debido al potencial eléctrico que afecta a la misma. En naranja las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, en amarillo la porción hidrofóbica compuesta por los ácidos grasos y en rojo las moléculas de DPA

la misma en respuesta de su potencial eléctrico. Además, a pesar de no contar con fluorescencia, se ha utilizado como par FRET para una variada cantidad de fluoróforos donadores debido a su espectro de absorción que se localiza en la región azul del espectro visible (Figura 16).

En el presente trabajo el uso del DPA involucra dos modalidades experimentales que se detallarán más adelante y en las cuales se valora la distancia de las proteínas fluorescentes con respecto a la membrana celular, por lo que se procederá a describir el modelo para correlacionar las mediciones de la eficiencia de FRET con la separación de las proteínas fluorescentes de la membrana.

Retomando un modelo desarrollado anteriormente en el laboratorio [48], se calculó la eficiencia de FRET estimando las distancias entre cada donador (una o dos proteínas fluorescentes idénticas asumiendo que el canal H_{V1} se expresa en dímeros y el H_{V1}ΔC en monómeros) y múltiples moléculas de aceptor DPA colocadas aleatoriamente dentro de la membrana. Para dicha estimación se usó la siguiente fórmula:

$$E_{n_d n_a} = \frac{1}{n_d} \sum_{i=1}^{n_d} \left[\frac{R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}}{1 + R_0^6 \sum_j^{n_a} \frac{1}{r_{ij}^6}} \right] \quad (\text{Eq.7})$$

Donde n_d es el número de donadores, n_a es el número de aceptores, r_{ij} es la distancia que hay entre la j molécula de DPA y la i de Venus o tagRFP. Dicha distancia se calcula a través de coordenadas tridimensionales:

$$r_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (\text{Eq.8})$$

Donde x , y y z son las coordenadas medidas en Angstroms del donador y el aceptor. Cómo se conocen las coordenadas x_i y y_i gracias a los experimentos realizados por el Dr. Víctor De la Rosa Jiménez [56], se puede realizar una simulación mediante la cual se varían los valores de la coordenada z_i hasta que el resultado de la ecuación sea cercano al valor del apagamiento de la emisión de las moléculas donadoras, tagRFP y Venus, en los experimentos. Dicha simulación corre hasta valuar el número de moléculas de DPA que, de acuerdo con la concentración experimental ($20\mu\text{l}$), se fijó en 1400 (Figura 17).

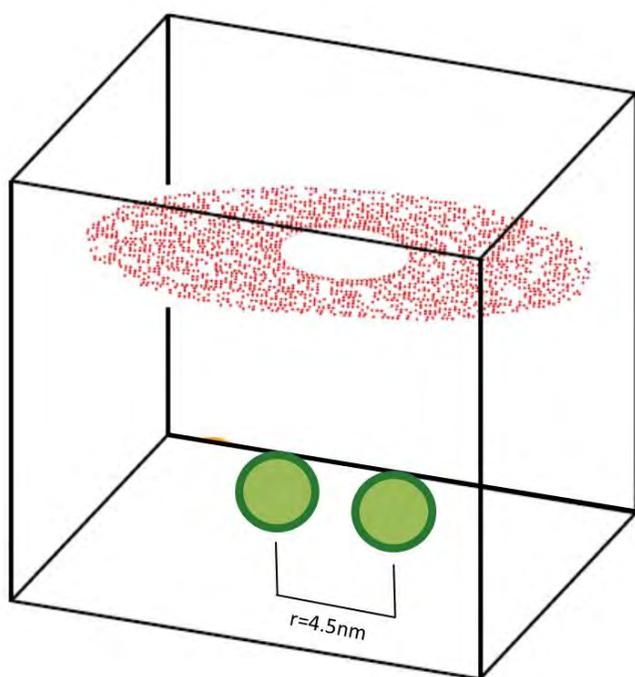


Figura 17. Modelo de la construcción Hv1-Venus que describe la localización espacial de las proteínas fluorescentes venus (esferas verdes) y las moléculas de DPA distribuidas en la bicapa lipídica. Se muestra la distancia de separación entre los dos fluoróforos obtenida en la literatura. Modificado de 45

5.4.2 Obtención de Datos

La variación de fluorescencia debido a FRET se midió utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon TE-2000U) que utiliza un Láser Ar-Ion (Spectra-Physics); el láser está acoplado al puerto de iluminación del microscopio mediante un riel de componentes ópticos diseñado y fabricado en nuestro laboratorio: lente bola 3mm, filtros de densidad neutra (nd), lente colimador de 50mm de distancia focal y un lente de 300mm que enfoca al haz de luz al objetivo. En los experimentos

realizados con H_{VI}ΔC el láser estuvo acoplado una fibra óptica monomodal que le concedía la luz al sistema óptico (Figura 18).

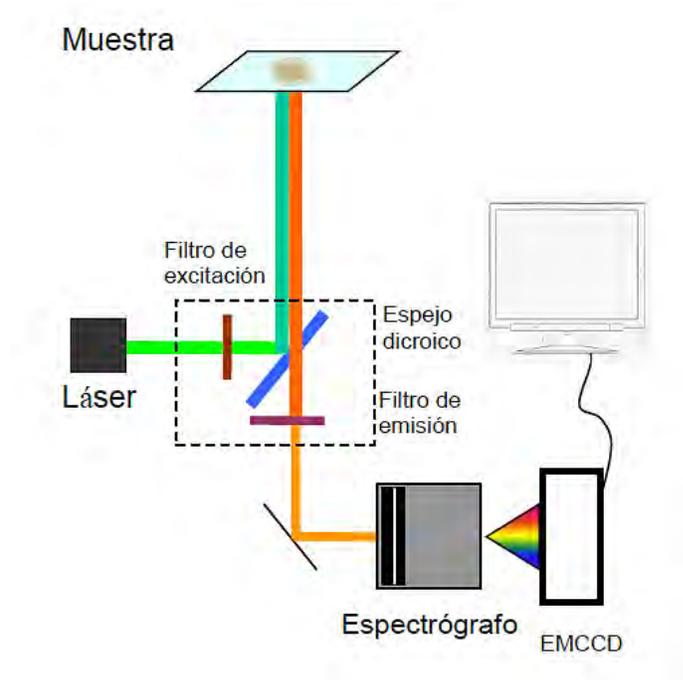


Figura 18. Esquema de la configuración de los equipos utilizados en la obtención de fluorescencia durante los experimentos. La línea punteada indica el cubo del microscopio en donde se colocan el espejo dicroico y los filtros de emisión y excitación para elegir las longitudes de onda de interés. EMCCD: cámara. Modificada de 53

El láser cuenta con tres líneas de luz principales: 458nm, 488nm y 514nm. Se utilizaron las últimas dos como fuente de excitación, 488nm para Venus y 514nm para tagRFP. Para la elección de cada una de estas líneas se utilizó una combinación específica de un filtro de excitación, un espejo dicroico y un filtro de emisión que se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Arreglos de líneas de luz, filtros de excitación y emisión junto con el espejo dicroico que se usaron para cada proteína fluorescente.

Proteína Fluorescente	Línea	Filtro de excitación	Espejo dicroico	Filtro de emisión
Venus	488	488/10x	z488rdc	HQ535/22bp
tagRFP	514	514/10x	z514rdc	HQ530lp

El tiempo de exposición de la muestra al láser fue controlado por un obturador Uniblitz VMM-D1 (Vincent Associates) colocado a la salida del láser y controlado por el software Micromanager (versión 1.4). Las muestras se observaron en el microscopio

de epifluorescencia con un objetivo de inmersión Nikon x60, con una apertura numérica de 1.4. El microscopio se acopló aun espectrógrafo de gradilla Spectra Pro 2150i (Acton Instruments) que se controló a través de su propio software. La luz era captada mediante una cámara CCD (Luca, Andor o iXon Ultra, Andor) controlada por Micromanager. Las imágenes de las fluorescencias obtenidas en los experimentos se analizaron con los programas Image J [57] e Igor Pro (Wavemetrics)

5.4.3 Elección de las proteínas fluorescentes.

Se calculó el R_0 de diferentes proteínas fluorescentes con relación al espectro de absorción del DPA, con ayuda de la base de datos sobre dichas proteínas que se encuentra en el portal electrónico de la Universidad de California en San Francisco [58] y verificando la información con espectros realizados en nuestro laboratorio. Se eligió inicialmente a la proteína Venus que se encontraba previamente en el vector donado. Ésta proteína tiene un R_0 de 37 Å en relación al DPA. A pesar de ser un buen par FRET con la molécula aceptora, el fluoróforo de Venus posee un pKa de 5.6, lo que motiva a que existan posibles fenómenos de cambios de fluorescencia dependientes a la modificación del pH local causado por el transporte de protones a alta velocidad al

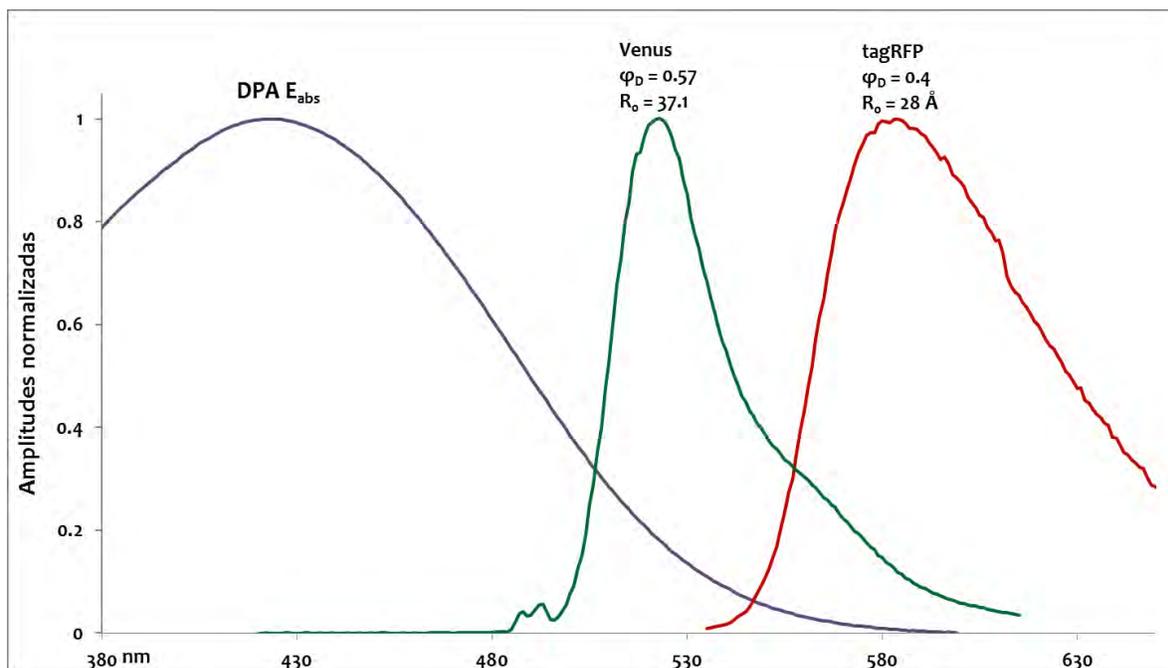


Figura 19. Espectros de emisión de las proteínas venus y tagRFP superpuestos al espectro de absorción del DPA. En cada espectro de emisión se colocó el rendimiento cuántico (ϕ_D) y el R_0 calculado con el DPA.

abrirse el canal iónico. Estos fenómenos dificultan estimar si la perturbación de la fluorescencia sea únicamente por FRET, provocando que los experimentos con Venus se realicen a un pH neutro ya que a este pH el fluoróforo se encuentra al 90% de su máxima emisión con respecto a la intensidad de excitación y a la respuesta del fluoróforo al pH.

Buscando una proteína que tuviera un pKa más ácido en el fluoróforo, para evitar la presencia de los fenómenos relacionados con el pH mencionados previamente, y que además tuviera un R_0 en relación al DPA menor, permitiendo una mejor precepción del movimiento del S₄ del canal ya que aumentaría la sensibilidad del FRET, se encontró con la proteína fluorescente roja tagRFP que tiene un pKa reportado de 3.8 y un rendimiento cuántico de 0.48 [59]. Además, presenta un pico máximo de excitación en los 555nm y un pico máximo de emisión en 584nm. Al calcular el R_0 en relación la molécula de DPA, se obtuvo un valor de 28 Å (Figura 19).

5.5 Patch-Clamp Fluorometry

Para la determinación del movimiento perpendicular del S₄ del canal H_{v1} y H_{v1}ΔC se realizó la técnica Patch-Clamp Fluorometry. En este apartado se describirá la parte de fluorescencia de este método experimental.

Al momento de realizar los experimentos, se retiró mecánicamente la membrana vitelina al ovocito y se mantuvo dentro de la solución de baño con DPA (20μM) durante 3 a 5 minutos antes de realizar el parche para que la molécula aceptora se internalice en la membrana celular. Las imágenes de los parches fueron concebidas durante el primer y el segundo pulso de la familia de pulsos anteriormente descrita, con una exposición de 300 ms, filtro nd 20, ganancia 100, BIN 1, temperatura del chip de la cámara -120 (grados C). El análisis de las imágenes se realizó en los parches que cumplieron con las características de corriente anteriormente descritas. Con respecto a la fluorescencia, sólo se consideraron los parches que contenían vacuolas y proteínas citosólicas en menos del 50 % de la imagen obtenida del parche,

esto con motivo de valorar con mayor precisión la membrana. Se evaluó la fluorescencia de un “Region of Interest” (ROI) que contenía la región superior del parche, al cual se le restó la fluorescencia basal de la imagen para conseguir la fluorescencia absoluta (Figura 20).

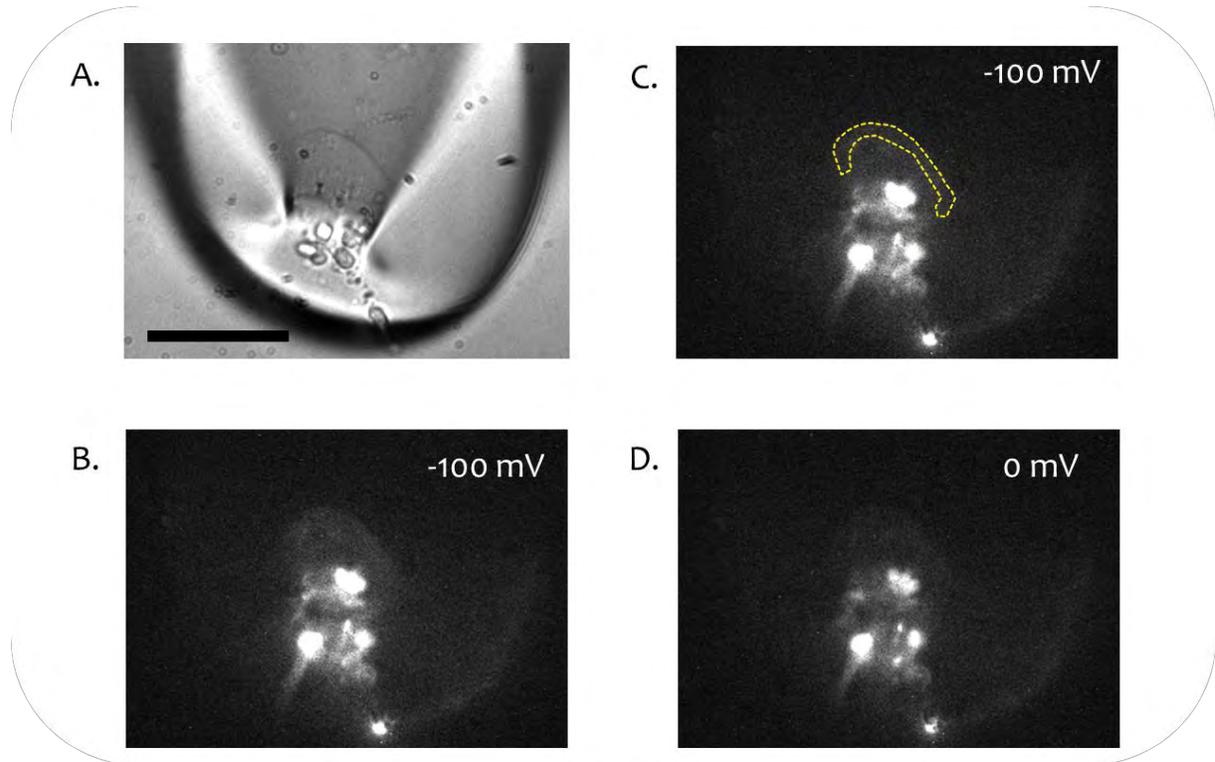


Figura 20. Representación de la evaluación de los parches obtenidos con la técnica Patch-clamp Fluorometry. A. Parche en campo claro. B. Mismo parche bajo la estimulación del láser y con el voltaje fijo a -100mV. Nótese la fluorescencia de las vacuolas que no forman parte del parche, resaltando la importancia de valorar solamente la membrana. C. Se representa el ROI específico para ese parche en orden de captar su fluorescencia. D. mismo parche siendo excitado por el láser pero con el voltaje fijo a 0mV. Se nota cualitativamente la disminución de fluorescencia del parche. Barra, 10 μ M

Para la estimación de la reducción de la fluorescencia (apagamiento) debido al FRET provocado el movimiento del DPA dentro de la membrana y del S₄, se normalizó la fluorescencia de los parches medidos mediante la siguiente ecuación:

$$Apagamiento_{relativo} = \frac{F_{Vtest} - F_{-100mVtest}}{F_{Vtestm\acute{a}x} - F_{-100mVtest}} = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} \quad (Eq.9)$$

Donde $F_{V_{test}}$ es la fluorescencia del pulso prueba, $F_{-100mV_{test}}$ es la fluorescencia al pulso de -100mV del respectivo al pulso prueba y $F_{V_{testm\acute{a}x}}$ es la fluorescencia del pulso del máximo voltaje alcanzado por el parche. Esta ecuación permite estandarizar la proporción de apagamiento de cada parche ya que los rangos de tamaño y expresión de los parches son tan amplios que no se pueden comparar uno con otro sin normalización.

Los datos obtenidos de la fluorescencia relativa fueron ajustados a dos ecuaciones de Boltzmann. La primera describe la dependencia del voltaje en el movimiento intramembranal del DPA como se ha obtenido experimentalmente en los trabajos previos del Dr. Víctor De la Rosa, mientras la segunda describiría el movimiento del VSD si es que este es notable:

$$A_{norm} = \frac{F_{DPA}}{1 + \exp\left(-\frac{z_{DPA}(V - 30mV)}{k_B T}\right)} + \frac{F_{VSD}}{1 + \exp\left(-\frac{z_{H^+}(V - V_{0.5VSD})}{k_B T}\right)}$$

(Eq.10)

Donde A_{norm} es el apagamiento normalizado, z_{DPA} es la carga del DPA y z_{H^+} es la carga de un protón.

5.6 Membrane Sheets o sábanas de membrana

Para calcular el valor de la distancia entre la proteína fluorescente unida al canal iónico y la membrana en condiciones de reposo, estimar el pKa de las proteínas fluorescentes, así como para valorar la expresión y el espectro de emisión de la proteína de fusión en nuestro modelo biológico, se aplicó una técnica llamada “Membrane sheets” o sábanas de membrana [60]. En este método, después de que la membrana vitelina del ovocito es removida, se coloca a la célula en una cámara cuyo fondo es un cubreobjetos que se ha tratado previamente con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich). Las cargas positivas de esta sustancia mejorarán la adherencia de la membrana al vidrio al atraer electrostáticamente las cargas negativas de la bicapa

lipídica. Se dejó reposar al ovocito en la cámara un rango aproximado de 30 a 60 minutos. Luego se separó al ovocito del cubreobjetos mecánicamente. Éste procedimiento permitió que una parte de la membrana del ovocito quedara adherida al fondo de la cámara. Gentilmente, la membrana es lavada con una solución de NaCl a 0.5 M para remover contenido intracelular de la sábana (Figura 21).

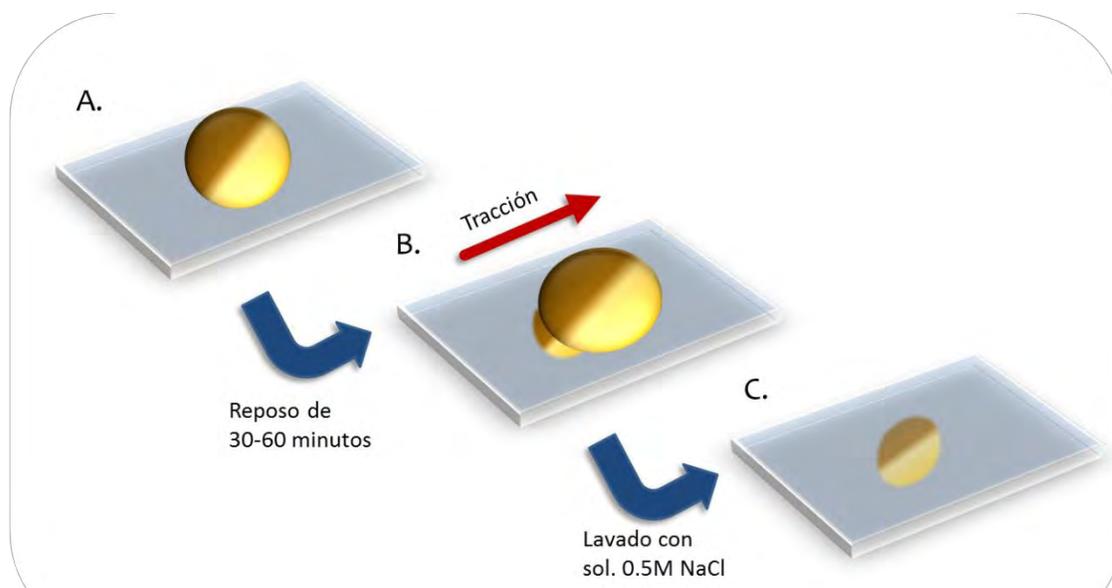


Figura 21. Esquema del procedimiento técnico de creación de sábanas de membrana. A. Se coloca el ovocito sin membrana vitelina sobre un cubreobjetos tratado previamente con poli-D-lisina. B. La tracción se hace suavemente y con un movimiento rápido hacia una dirección usando una pipeta Pasteur. C. Se lava gentilmente un par de ocasiones antes de comenzar el experimento para asegurar el retiro de material citoplasmático y vacuolar.

Para los experimentos de distancia entre la membrana y el fluoróforo, en primera instancia a cada sábana se le tomó una imagen con solución ND96 (pH 7.0) y después se aplicó un protocolo de captación de imágenes en donde se tomaba una imagen de la fluorescencia de la sábana cada 5 segundos durante 5 minutos (60 imágenes). La configuración de la cámara para los canales iónicos unidos a Venus fue: exposición 300ms, ganancia 100-500, filtro nd 30 BIN 1 y temperatura -120. Para los experimentos con tagRFP la configuración de captación de imágenes consistió en: exposición 300, ganancia 200-300, filtro nd 10, BIN 1 y temperatura -120. Este protocolo permitió estimar el grado de fotoblanqueo por la estimulación del láser hacia el fluoróforo.

En otros experimentos con la misma configuración inicial, después de obtener la imagen con la solución Nd96, se cambia la solución de baño por una que contiene DPA a la misma concentración que los experimentos con Patch-clamp Fluorometry (20 μ M) a un pH de 7. Se toma una imagen de la fluorescencia inmediatamente después de la colocación de la nueva solución y, aproximadamente un minuto después, se corre el protocolo de 60 captaciones de imágenes de fluorescencia cada 5 segundos durante 5 minutos, con las mismas configuraciones en la cámara específicas para cada proteína fluorescente. Esta metodología pretende evaluar el apagamiento del donador debido a FRET entre las proteínas fluorescentes y el DPA.

En ambas series de experimentos anteriormente descritos a las imágenes recolectadas se les analizó la fluorescencia de un área determinada por un ROI de 169 píxeles. A la fluorescencia media del área se le sustrajo la fluorescencia basal de la imagen y se normalizaron con el valor máximo.

Para poder determinar el pKa de las proteínas fluorescentes utilizadas en este trabajo, se realizaron otra serie de experimentos en los cuales, a partir de la configuración inicial, se reemplazó el pH del baño de manera gradual desde un pH básico hasta uno ácido mientras se tomaban imágenes de la fluorescencia emitida por la sábana de membrana en cada cambio de solución. En los experimentos con Venus se usaron los siguientes pH: 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.0 y 3.0. En los experimentos con tagRFP se usaron pH de 7.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 (Figura 22). La constitución de las soluciones usadas es idéntica para los experimentos descritos anteriormente (véase en la sección de Electrofisiología), sin embargo la titulación a diferentes pH fue más amplia. En busca de poder controlar la concentración de hidrogeniones se utilizaron distintos buffers: Citrato de sodio para magnitudes de pH 2.5 a 5, MES para 5.5 a 6.5 y HEPES de pH 7 en adelante.

Se analizó la fluorescencia media de un ROI de 169 píxeles (13 x 13 pix.) a los cuales se les restó la fluorescencia de fondo (background) de un ROI con la misma área. Después la fluorescencia se normalizó al pH más básico y los datos obtenidos se les ajustó la siguiente ecuación:

$$F = F_0 + \frac{(1 - F_0)}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$$

Donde F_0 es la fluorescencia residual a pH más bajo y pK_a es el pH en el cual $F = (1 + F_0)/2$.

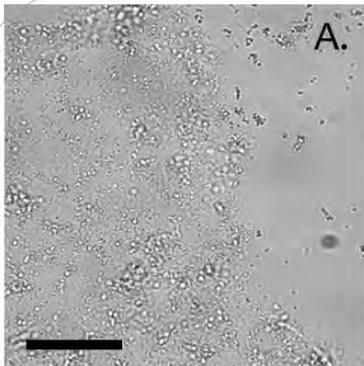
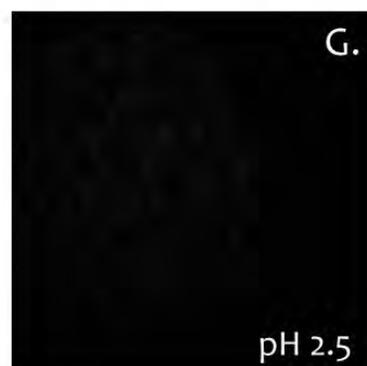
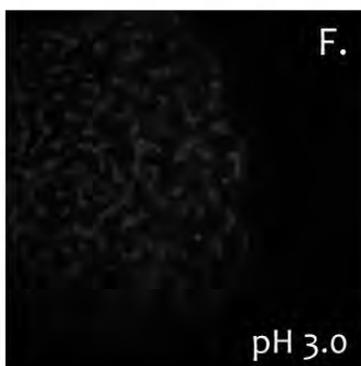
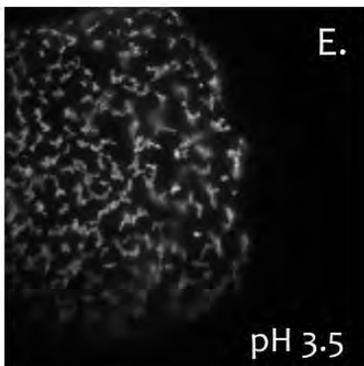
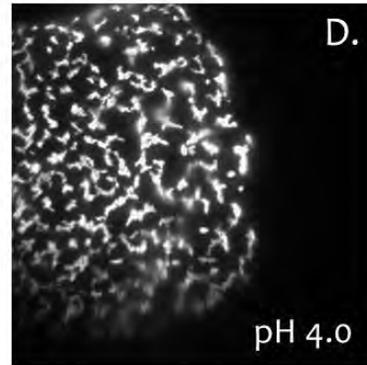
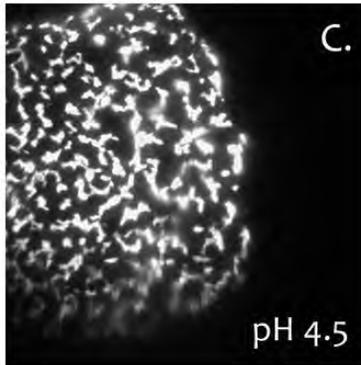
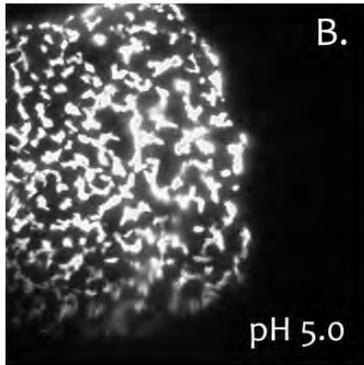


Figura 22. Representación de los experimentos de sábanas de membrana que expresan Hv1-tagRFP en donde se cambia el pH de las soluciones en búsqueda del pK_a de la proteína fluorescente. A. campo claro de la membrana unida al cubreobjetos. B – G. Fotos de la fluorescencia de la membrana siendo excitada por el láser a diferentes pH. Cada imagen muestra el pH a la que fue sometida. Barra, 20 μ M.



La toma de espectros se realizó captando la luz emitida por la sábana de membrana a través de una rendija del espectrógrafo que permite el paso de una pequeña parte de la luz hacia la gradilla de difracción dentro del mismo. La luz es descompuesta por la gradilla y redirigida hacia la cámara. En la imagen obtenida, el eje de las ordenadas representa la posición espacial de la muestra en la rendija mientras que el eje de las abscisas representa la longitud de onda del espectro de emisión. Dicho espectro se obtiene midiendo la intensidad en una línea horizontal en la imagen o “line scan” (Figura 23).

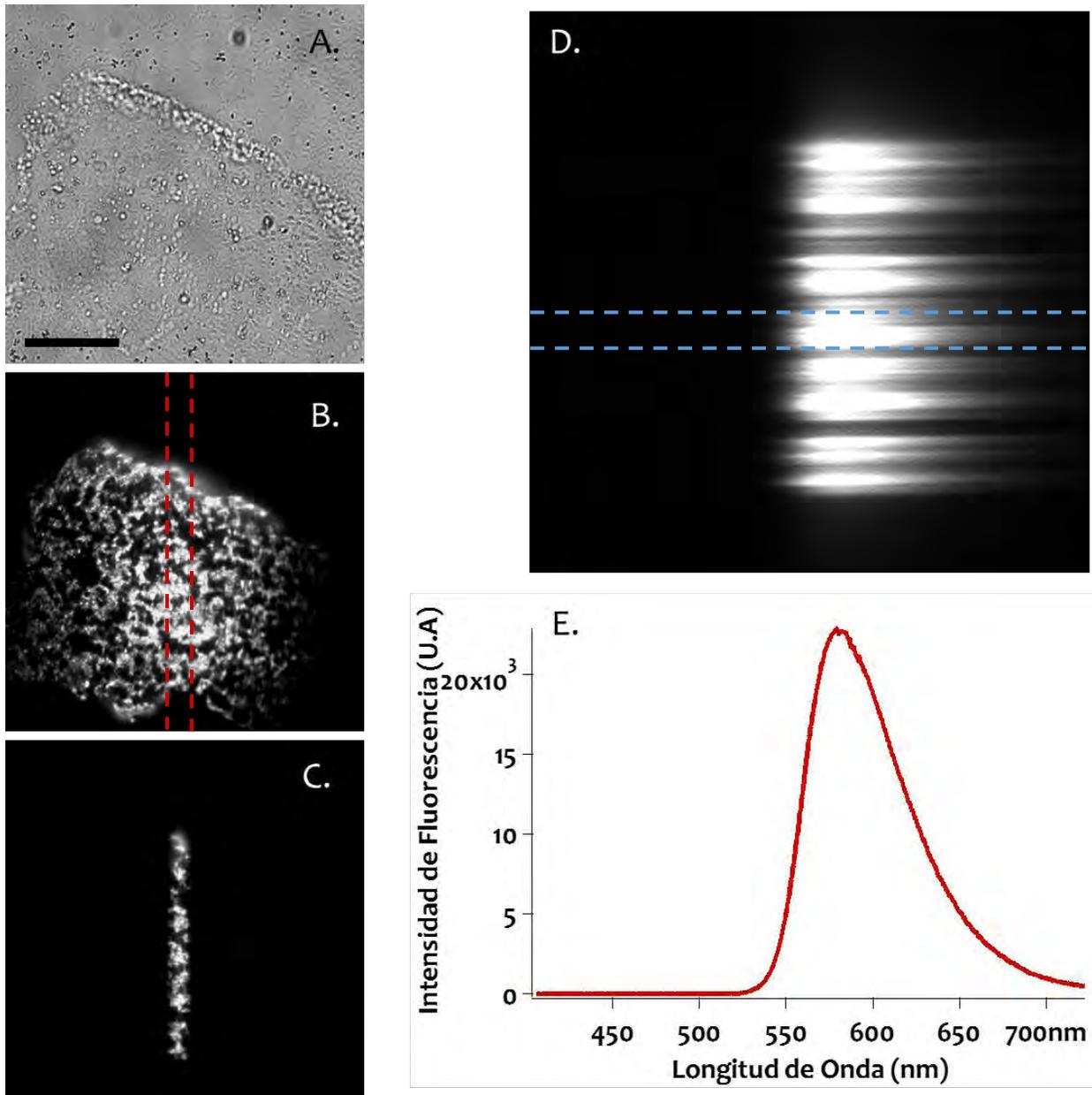


Figura 23. Representación del método de la recolección de espectros de la proteína Hv1-tagRFP. A. Sábana de membrana en campo claro. B. Fluorescencia de la misma sábana excitada con la línea de 514nm. Se representa el tamaño de la rendija con líneas punteadas rojas. C. Fluorescencia de la sábana que resulta de la limitación de la rendija. Esta luz se descompone en una imagen espectral mostrada en D. También en D se muestra entre dos líneas punteadas azules, el ROI o "line scan" de donde se obtiene el espectro de emisión de la proteína fluorescente, mostrada en E.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión y evaluación de proteínas fluorescentes tagRFP

Para este trabajo se utilizaron los resultados previamente obtenidos en el laboratorio sobre la expresión de la proteína fluorescente Venus, sin embargo no se había trabajado anteriormente con la proteína tagRFP unida a algún canal, razón por la cual fue importante caracterizar primero su nivel de expresión y verificar experimentalmente el pKa de su fluoróforo.

Se consiguieron 6 sábanas de membrana de ovocitos con la construcción H_{V1}-tagRFP dentro del vector pMax a las que se les midió el espectro de emisión. Se obtuvo un rango de 13700-22100 cuentas de gris (unidades arbitrarias) de intensidad fluorescencia expresado por los parches. Al normalizar los datos de los 6 espectros y promediarlos, se produjo un espectro que tiene un pico máximo de emisión en la longitud de onda de 584.1 nm. Después se comparó cualitativamente la morfología de su espectro en comparación con el registrado por Evrogen [61], notando una amplia identidad, lo que permitió suponer que el modelo biológico pudo expresar correctamente la proteína fluorescente (Figura 24).

En lo que respecta a la determinación del pKa, se pudieron estimar 6 sábanas de membrana de ovocitos con la misma construcción. Al momento de ajustar a los datos de fluorescencia la curva de protonación se encontró un pKa de 3.82 ± 0.03 que es idéntico al 3.8 reportado en la literatura. En la curva descrita, se observa que llega a un 94% de la fluorescencia máxima a un pH de 5, permaneciendo casi recto hasta el pH más básico que se valoró (7.5), lo que indica que puede con esta proteína fluorescente se puede cambiar el pH por 2 órdenes de magnitud sin que afecte significativamente a la fluorescencia, permitiendo que se puedan realizar varias configuraciones de experimentos en donde se varíe el pH de 5 a 7 sin que se presente el fenómenos de protonación anteriormente descritos que afectan a la fluorescencia (Figura 25).

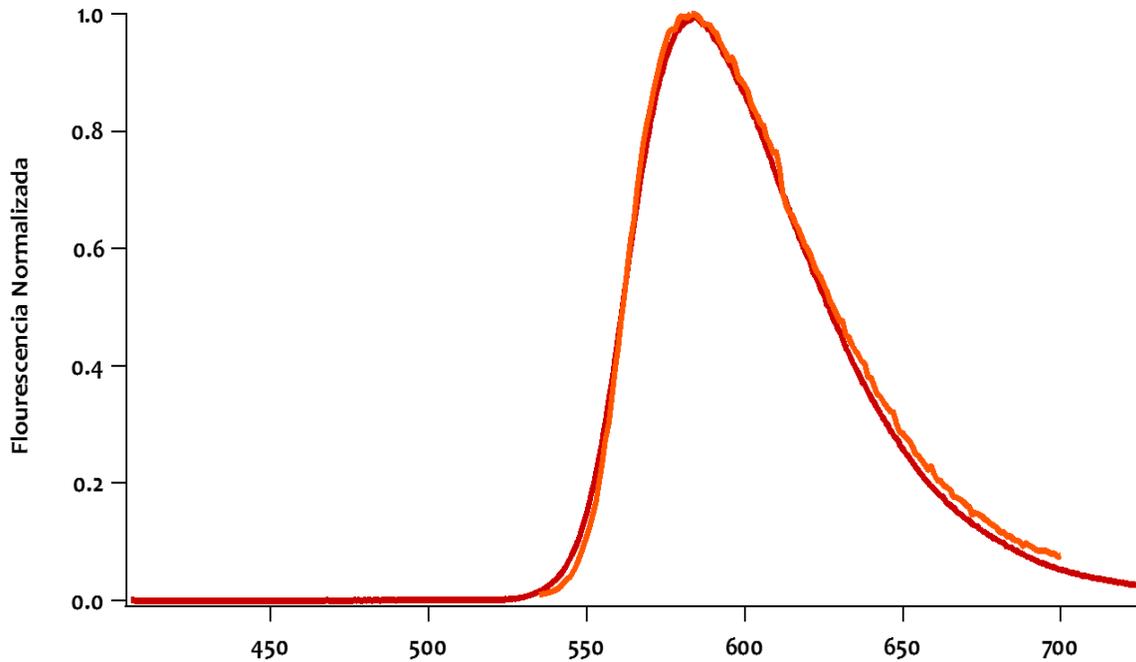


Figura 24. Comparación de espectros de emisión de tagRFP. En naranja se muestra el espectro reportado por Evrogen (referencia 59) y en rojo el espectro obtenido de manera experimental. Esta comparación nos permite asegurar que las membranas de los ovocitos expresan la proteína fluorescente correcta.

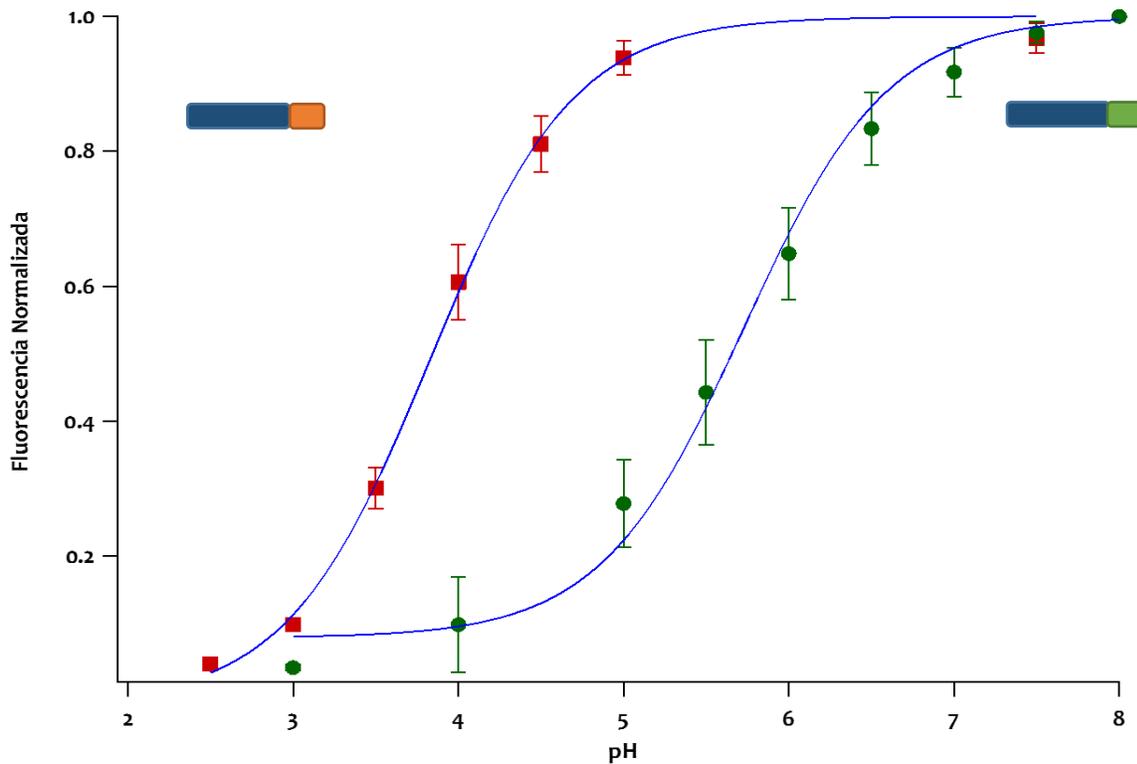


Figura 25. Comparación de las curvas de protonación (azul) de las proteínas fluorescentes Venus y tagRFP. Los datos de venus (círculos verdes) tienen un $pK_a=5.73 \pm 0.05$, a comparación de los datos de tagRFP (cuadros rojos) que tienen un $pK_a= 3.8 \pm 0.03$. La estabilidad en la fluorescencia de tagRFP desde el pH 5 en adelante nos permitió elegirla para hacer los experimentos con el canal iónico de protones.

6.2 Medición de la distancia entre la membrana y las proteínas fluorescentes

Habiendo obtenido los datos que comprobaran las características fluorescentes de Venus y tagRFP, se pudo realizar los experimentos que permitieron estimar si existía transferencia de energía por FRET entre éstas y el DPA, en condiciones donde estuviera abolido el potencial de membrana, permitiendo estimar a su vez la distancia entre el fluoróforo y la bicapa lipídica.

Se midió en primera instancia la proporción de fotoblanqueo producido por la exposición de la muestra a la captura de imágenes. Para ello se analizaron una cantidad de 3 sábanas de membrana para la proteína Venus y 5 sábanas para tagRFP. Se debe tener en cuenta que los respectivos experimentos para cada proteína fluorescente se realizaron con las mismas configuraciones en la cámara y en los filtros de densidad neutra (nd) para asegurar que las sábanas estuvieron expuestas el mismo tiempo y a la misma intensidad del láser. Para la proteína Venus las fotografías se tomaron con una exposición de 300ms y un filtro nd de 30. A su vez, las imágenes de tagRFP se adquirieron con una exposición de 300 ms y un filtro nd 10.

Los datos de los parches fueron normalizados y se les calculó el error estándar. Luego, se ajustó una exponencial ($y_0 + A^{(-invTau*x)}$) para poder calcular la tendencia del fotoblanqueo. Para Venus, con el protocolo de 60 fotos en 5 minutos, el valor de la exponencial fue: $y_0 = 0.87 \pm 0.00$, $A = 0.13 \pm 0.01$, $Tau (\tau) = 45.08s \pm 7.49$. Al final del protocolo la muestra presentó una fluorescencia de 0.86 ± 0.03 es decir, tuvo un 14% de fotoblanqueo (Figura 26). En lo que respecta a tagRFP el valor de su fluorescencia se redujo a una tendencia de $y_0 = 0.57 \pm 0.05$, $A = 0.42 \pm 0.04$, $\tau = 1644.53s \pm 392.39$. Al final del experimento la intensidad de fluorescencia fue de 0.88 ± 0.01 , o sea, tuvo un 12% de fotoblanqueo (Figura 27).

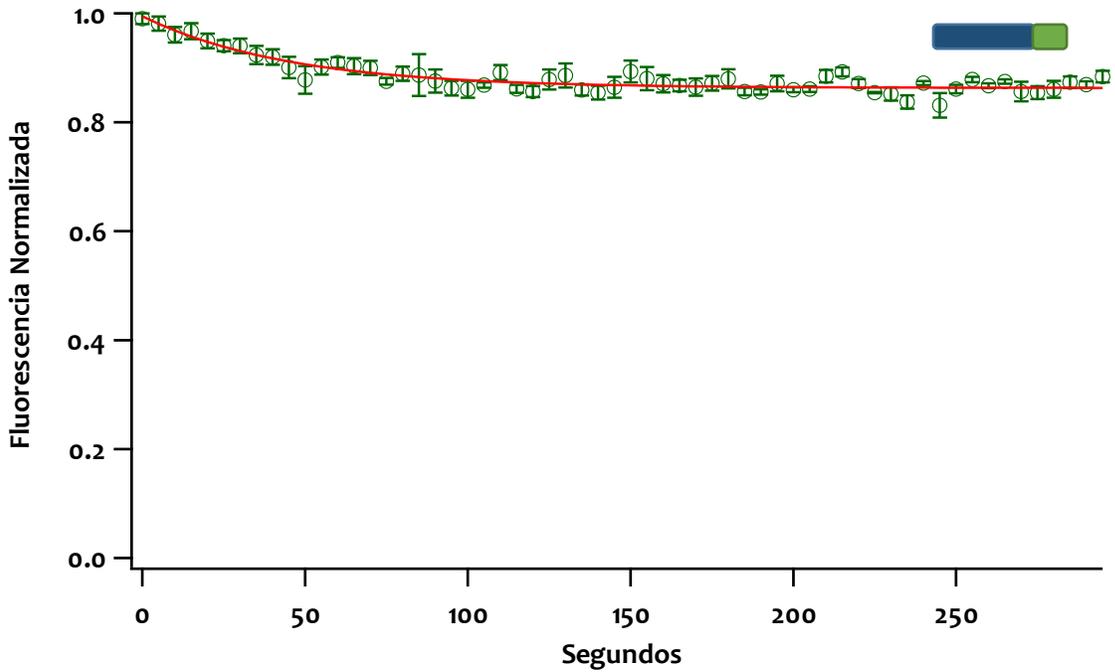


Figura 26. Fotoblanqueo estimado de la construcción HV1-Venus. La tendencia del apagamiento es $y_0 = 0.86 \pm 0.001$, $A = 0.13 \pm 0.01$, $\tau = 45.08s \pm 7.49$. Al final del protocolo la fluorescencia se redujo un 10%.

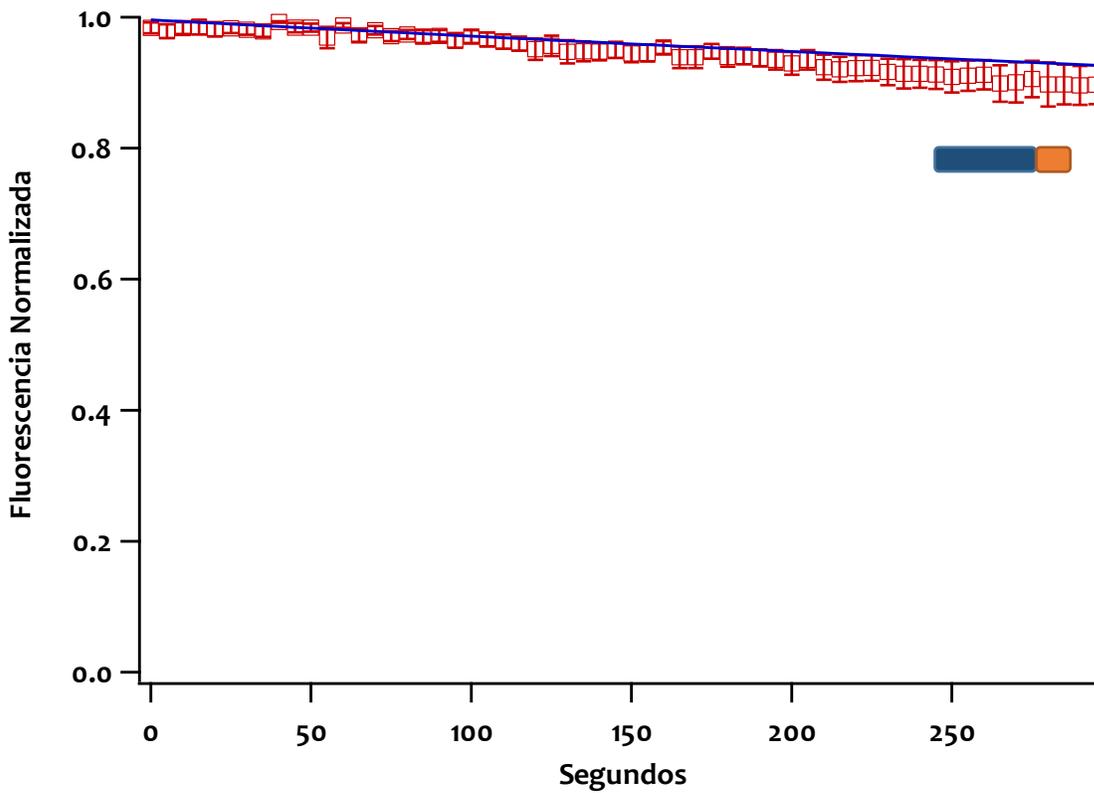


Figura 27. Fotoblanqueo estimado de la construcción HV1-tagRFP. La tendencia del apagamiento es $y_0 = 0.57 \pm 0.05$, $A = 0.42 \pm 0.05$, $\tau = 1644.53s \pm 392.39$. Al final del protocolo la fluorescencia se redujo un 12%

Después de haber obtenido las tendencias de fotoblanqueo del que es responsable el protocolo de captación de imágenes, se procedió a obtener el apagamiento de la proteína fluorescente causado por la transferencia de energía hacia el DPA. A los datos obtenidos de las sábanas de membrana a las cuales se agregó DPA, se les sustrajo la exponencial descrita del fotoblanqueo de experimentos anteriores para poseer únicamente la reducción de fluorescencia debida a FRET. A éste apagamiento corregido a su vez, se le ajustó una exponencial para conocer el nivel de fluorescencia alcanzado después de agregar el DPA.

Se consiguieron realizar 3 “membrane sheets” para los experimentos con la proteína de fusión H_{V1}-Venus. Se ajustó una doble exponencial a la fluorescencia y se obtuvieron los siguientes datos: $y_0=0.43 \pm 0.07$, $A_1=0.32 \pm 0.04$, $\tau_1= 424.19s \pm 0.33$, $A_2=0.00 \pm 1.34$, $\tau_2=2.02s \pm 46.94$. La exponencial alcanza un valor constante de 0.57,

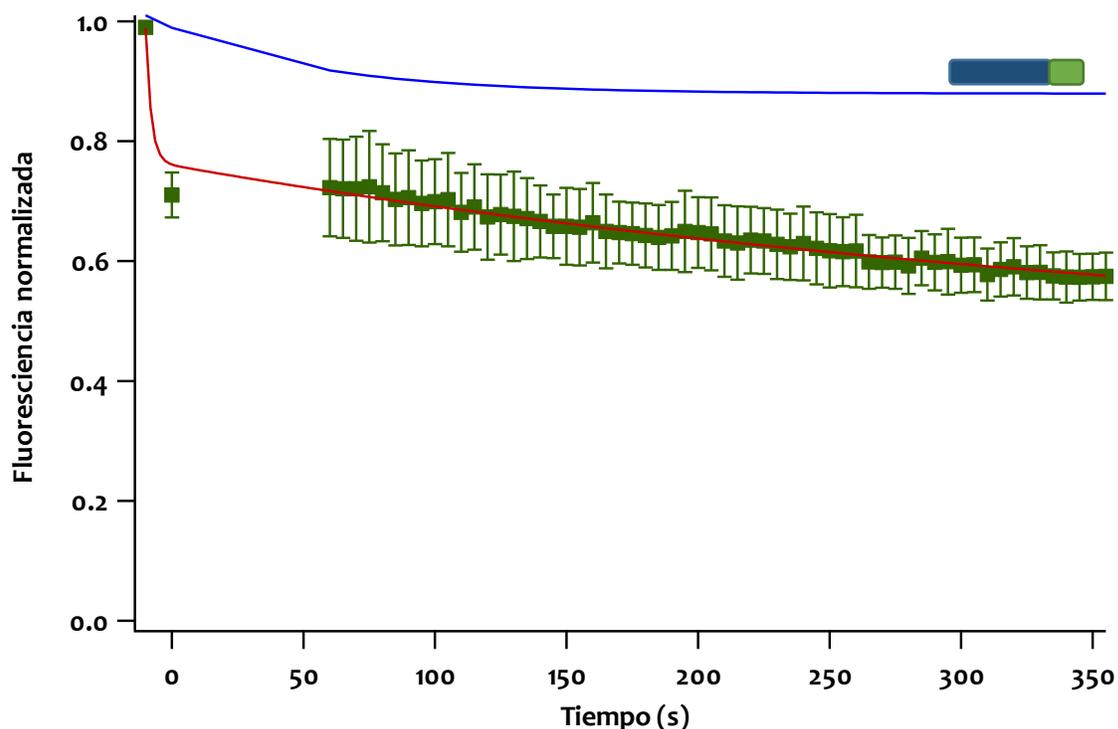


Figura 28. Eficiencia de FRET entre Venus y la membrana en reposo con la construcción H_{V1}-Venus. Se tomó una imagen de la fluorescencia de la membrana previa a la colocación del DPA (primer punto). Se adquirió una imagen inmediatamente después de colocar el DPA (segundo punto) y un minuto después se corrió el protocolo de captación de imágenes. A los datos se les sustrajo el fotoblanqueo (línea azul). Al final se obtuvieron los datos a los cuales se les ajustó una exponencial que arrojó un apagamiento neto debido a una Eficiencia de FRET del 43%.

entonces, la fluorescencia decae a 0.57 al colocar DPA en la solución de baño, o sea, hay una eficiencia de FRET del 43% (Figura 28). Estos resultados concuerdan con un trabajo previo, la proteína venus fusionada a un canal H_{v1} tiene un apagamiento, eficiencia aparente, cercana al 40%.

De acuerdo con este estudio previo en nuestro laboratorio [56], una eficiencia del 40% se relacionaba, con la simulación previamente señalada, con una distancia de 8.5nm u 85Å. Por lo que pensamos que en nuestro experimento presenta la misma distancia.

En los experimentos para la construcción H_{v1}-tagRFP, se analizó la fluorescencia de 7 sábanas de membrana. A estos datos de fluorescencia, después de haberles sustraído el fotoblanqueo, se les ajustó una exponencial que arrojó los siguientes datos: $y_0 = 0.89 \pm 0.001$, $A = 0.08 \pm 0.003$, $\tau = 59.13s \pm 934.57$. De estos datos se puede estimar que la

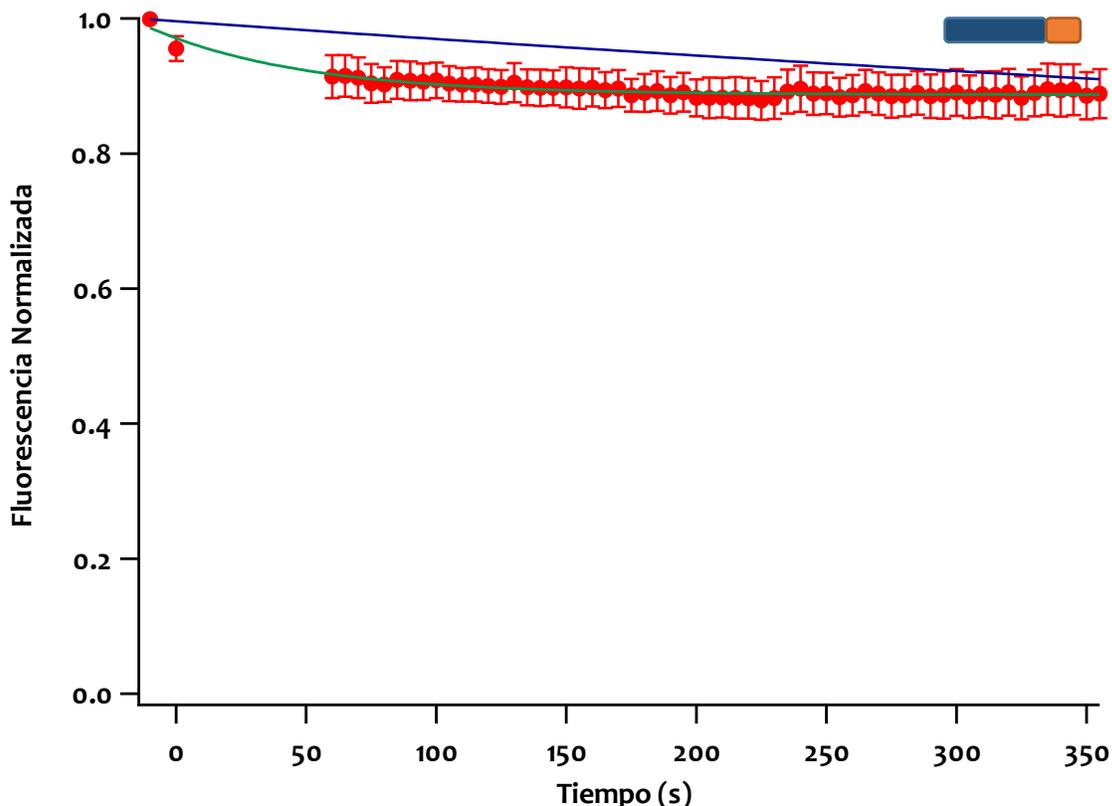


Figura 29. Eficiencia de FRET entre tagRFP y la membrana en reposo con la construcción H_{v1}-TagRFP. Se aplicó el mismo protocolo descrito en el texto y a los datos se les sustrajo el fotoblanqueo (línea azul). Al final se obtuvieron los datos a los cuales se les ajustó una exponencial que arrojó un apagamiento neto debido a una Eficiencia de FRET del 12%.

$$A = 0.01091 \pm 0.00107$$

fluorescencia se ha reducido a un 0.88 al colocar DPA en la solución, lo que se deriva en un 12% de eficiencia de FRET (Figura 29). Es una eficiencia menor que con Venus, esto puede ser explicado gracias a que la R_0 que se obtiene de la relación tagRFP-DPA es alrededor de 1.1 nm menor a la obtenida con la relación de espectros de Venus-DPA.

Se analizaron también la fluorescencia de 4 sábanas de membrana con la construcción $H_{V1}\Delta C$ -tagRFP. Después de procesar las imágenes como en las anteriores construcciones, se adquirieron los siguientes resultados de la exponencial ajustada a la disminución de fluorescencia: $y_0 = 0.69 \pm 0.00$, $A = 0.05 \pm 0.007$, $\tau = 5.56s \pm 65.35$. A partir de estos datos se observa que la fluorescencia disminuye a 0.69 al colocar DPA en la solución de baño, resultando en una eficiencia de transferencia de 31% (Figura 30). La transferencia de energía es más alta que en la construcción H_{V1} -tagRFP debido

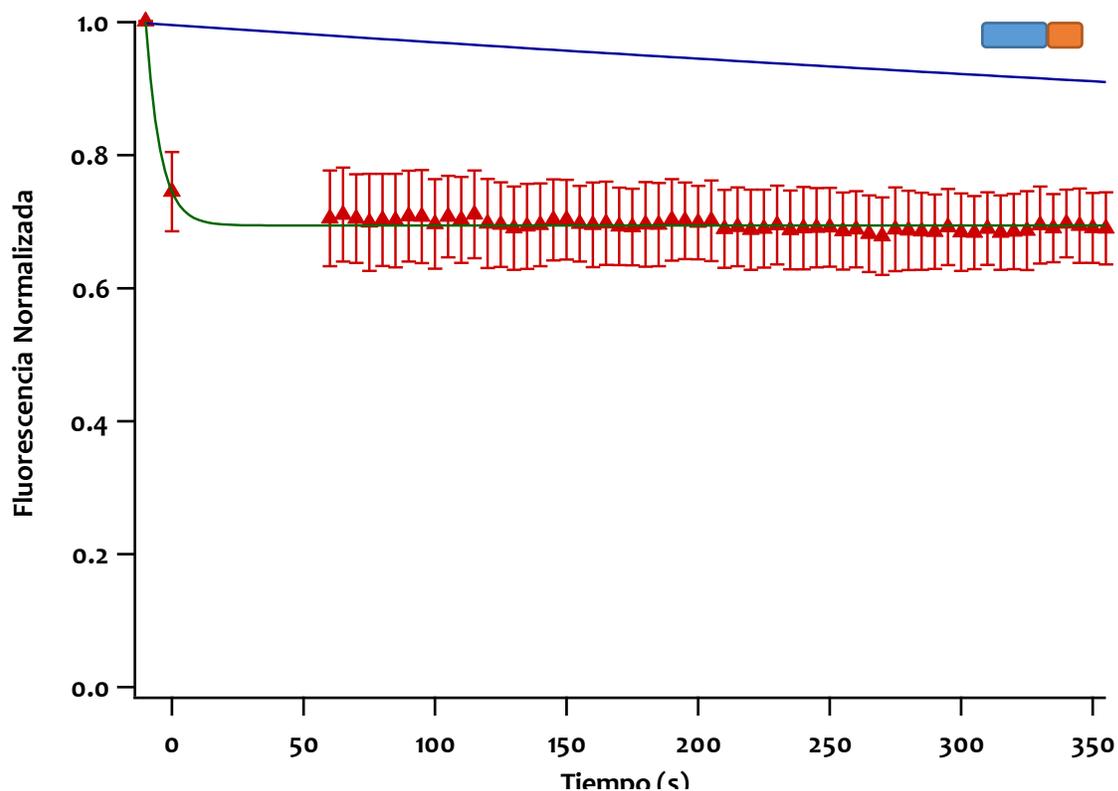


Figura 30. Eficiencia de FRET entre tagRFP y la membrana en reposo con la construcción H_{V1} -TagRFP. Se aplicó el mismo protocolo descrito en el texto y a los datos se les sustrajo el fotobleaching (línea azul). Al final se obtuvieron los datos a los cuales se les ajustó una exponencial que arrojó un apagamiento neto debido a una Eficiencia de FRET del 12%.

$$\begin{aligned} \dot{A} &= 0.050853 \pm 0.00771 \\ \text{invTau} &= 0.17981 \pm 0.0153 \end{aligned}$$

a que al retirar el coiled-coil, de unos 6.5nm de longitud, la proteína fluorescente queda más próxima a la membrana y por ende al DPA embebido en ella.

6.3 Medición del movimiento del S₄ del canal H_{v1}ΔC-Venus

Habiendo estimado cuánto se reduce la fluorescencia gracias a la exposición de la membrana, que expresa las construcciones del canal iónico con las proteínas fluorescentes, al DPA, y pudiendo estimar la distancia que se encuentra entre el fluoróforo de dichas proteínas y la bicapa lipídica, se trató de estimar el movimiento del S₄ dado a la activación del canal a través de la técnica Patch-clamp Fluorometry.

6.3.1 Construcción H_{v1}ΔC-Venus

6.3.1.1 Electrofisiología de los canales iónicos

Se lograron un número de 10 parches con el canal H_{v1}ΔC-Venus que cumplían con las características requeridas (corrientes mayores a 50pA a pulso de 100mV y membranas con una limpieza de proteínas y vacuolas de más del 50%). Las soluciones de baño y de la pipeta (intracelular y extracelular, respectivamente) se titularon a pH=7 ($\Delta\text{pH} = 0$). Las corrientes se encontraron en un rango de 62 a 200pA (Figura 31) debido a la variabilidad de los tamaños y nivel de expresión de los parches.

Dado que el $\Delta\text{pH} = 0$, el potencial de reversión tiene el mismo valor ($V_{\text{rev}} = 0$). Además, gracias a que $V_{\text{rev}} = 0$, la V_t se encontraba desplazado hacia potenciales positivos, resultando en que las corrientes comiencen a apreciarse desde el pulso de 40mV. Se calculó la conductancia (G) por medio de la ecuación de Ohm, después se normalizaron los datos para que pudieran compararse unos con otros. Si se observan con detenimiento los resultados del cálculo de la conductancia, se encuentra que los voltajes más cercanos al potencial de equilibrio no se ajustan bien a la curva de la conductancia. Esto se debe a que entre más pequeña es la corriente, más inexacta es la estimación de la conductancia por parte de la ecuación. A pesar de este detalle, si

las corrientes tienen suficiente amplitud, la ley de Ohm permite que el ajuste con la ecuación de Boltzmann arroje datos adecuados sobre la $V_{0.5}$. En el caso de esta construcción se observó que la $V_{0.5}$ de activación del canal $H_{V1}\Delta C$ fue de $55.6 \text{ mV} \pm 7.14$ (Figura 32), con el transporte de una carga elemental e_0 de 1.2 ± 0.4 para poder abrir el canal.

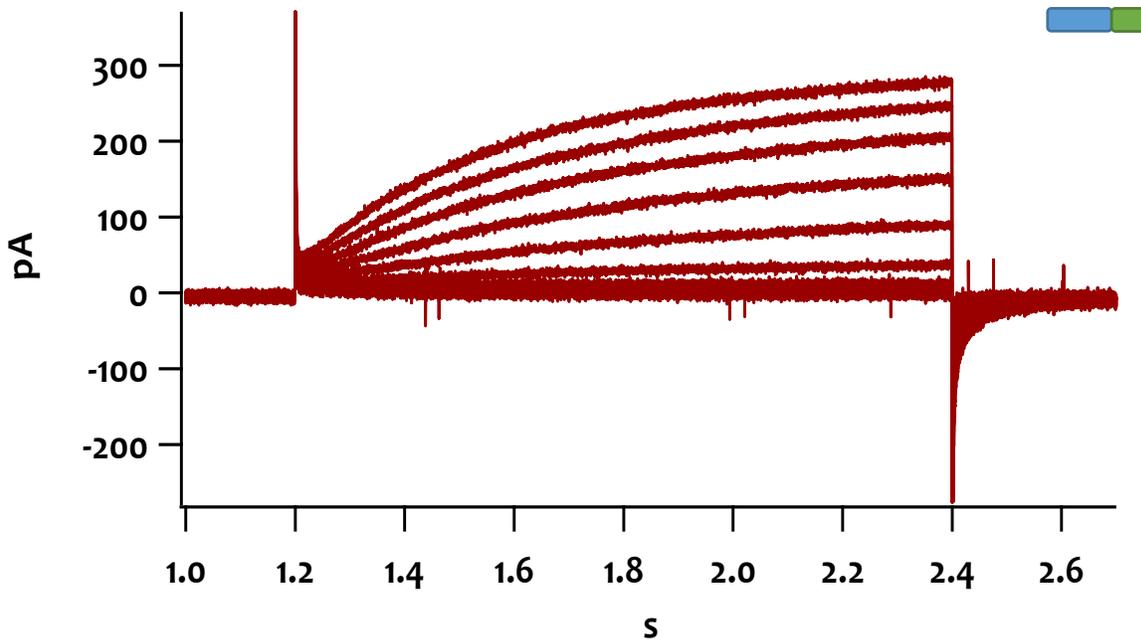


Figura 31. Familia de corrientes de la construcción $H_{V1}\Delta C$ -Venus. Los experimentos se realizaron $\Delta \text{pH}=0$.

6.3.1.2 Apagamiento de fluorescencia por el movimiento de S_4

En cuanto al análisis de la disminución de fluorescencia, se normalizó la fluorescencia siguiendo los cálculos de la ecuación propuesta en este trabajo. Después se les ajustó una suma de dos Boltzmann donde se divide el apagamiento en dos fenómenos: de uno es responsable el DPA desplazándose a través de la membrana celular, y de otro es responsable el movimiento del S_4 del canal H_{V1} . El movimiento del DPA se fijó a una $V_{0.5} = -30 \text{ mV}$ que es un voltaje que se obtuvo en experimentos previos en el laboratorio.

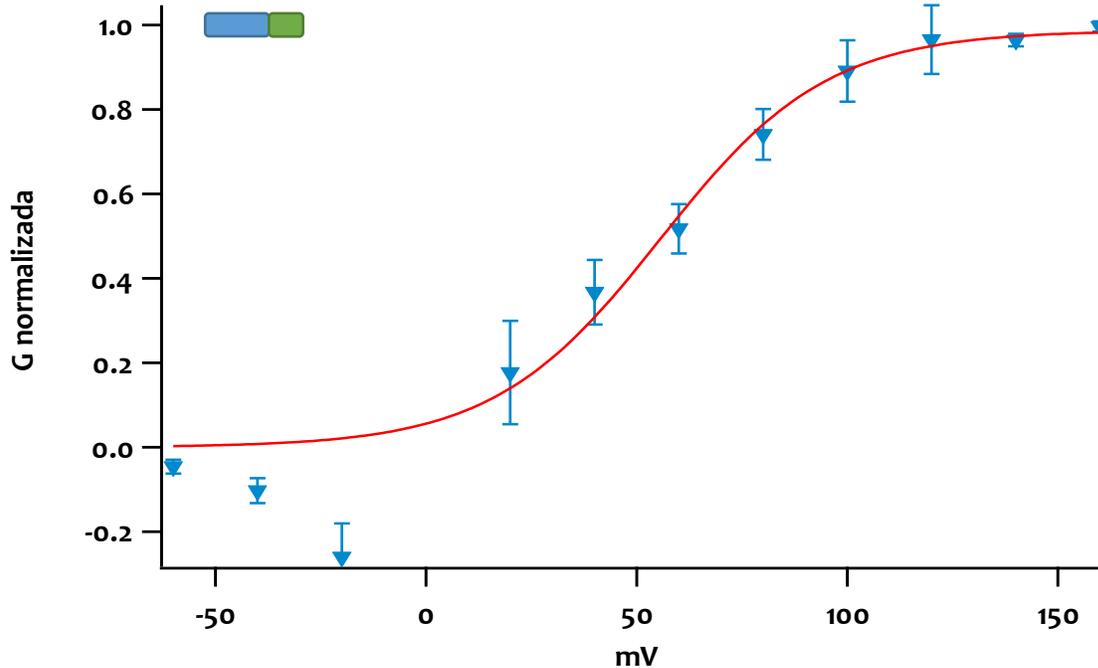


Figura 32. Conductancia de la construcción H_{V1}ΔC-Venus. Al ajustar los datos se obtuvo una $V_{0.5}$ de $55.64 \text{ mV} \pm 7.14$ y se estimó $e0$ en 1.26 ± 0.4 . Nótese que la conductancia es inexacta cuando se calcula cerca del potencial de reversión (0mV).

$$G = 1.26 \exp(-0.070 \pm 0.017 V)$$

Al ajustar los datos, se encontró un aumento en la proporción del apagamiento relativo que no se explica por el movimiento del DPA estimado por la suma de las dos Boltzmann a partir de 55mV. Este aumento en el apagamiento relativo tiene una $V_{0.5} = 95.4 \text{ mV} \pm 2.12$ y una carga aparente (z) de 0.98 ± 0.08 . El coeficiente de apagamiento relativo de este segundo componente tuvo un valor de 0.43 o 43% de todo el apagamiento de la fluorescencia, lo que podría indicar que probablemente el movimiento del S₄ del H_{V1}ΔC tuvo un desplazamiento significativo hacia la membrana al momento de activarse (Figura 33). El punto donde inicia este segundo apagamiento, según la curva ajustada, es un valor muy cercano a la $V_{0.5}$ que se obtuvo de la conductancia de la construcción. Posiblemente el movimiento pueda ser registrado hasta que haya sobrepasado el voltaje en donde el canal de la construcción se activa.

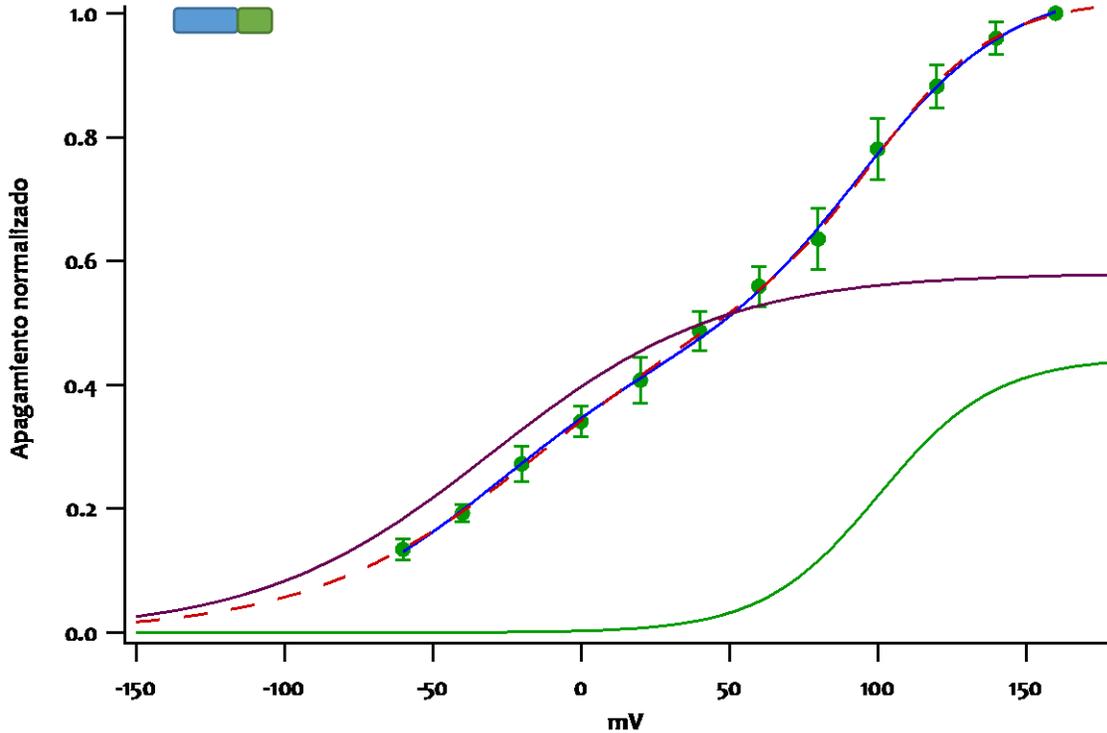


Figura 33. Gráfica de Apagamiento relativo vs Voltaje. Se muestran los datos de fluorescencia de los parches en cada pulso (marcas redondas verdes) junto con el ajuste de Boltzmann obtenido de esos datos (línea azul). También se representa una simulación de los datos siguiendo el mismo ajuste si se hubieran obtenido desde -150 (línea roja interrumpida), y los dos componentes del ajuste por separado: el movimiento relativo al DPA (línea violeta) y del VSD del H_v1ΔC (línea continua verde) con una $V_{1/2}$ de 30 mV y de 95.39 ± 2.12 respectivamente.

6.3.2 Construcción H_v1-Venus

6.3.2.1 Electrofisiología de los canales iónicos

En lo que respecta a la construcción con H_v1-Venus, se lograron un número de 6 parches que cumplieran con las características para ser analizados mencionadas previamente. Las soluciones de baño y de la pipeta (intracelular y extracelular, respectivamente) se titularon a pH=7 (Δ pH = 0). Las corrientes máximas de las familias se encontraron en un rango de 130 a 230 pA. De igual manera que el experimento anterior, el potencial de reversión es igual a cero por lo que el V_t se encontraba también en potenciales positivos, observándose una elevación en la corriente desde el pulso de 40mV (Figura 34). Así mismo, la estimación de la conductancia presentó

problemas para calcularse en los pulsos donde las corrientes fueron muy pequeñas y alrededor del potencial de reversión (omV). El ajuste por la ecuación de Boltzmann arrojó una $V_{0.5}$ del canal de $49.21 \text{ mV} \pm 9.69$ y el transporte de una carga elemental e_0 de 1.19 ± 0.51 para poder abrir el canal iónico (Figura 35).

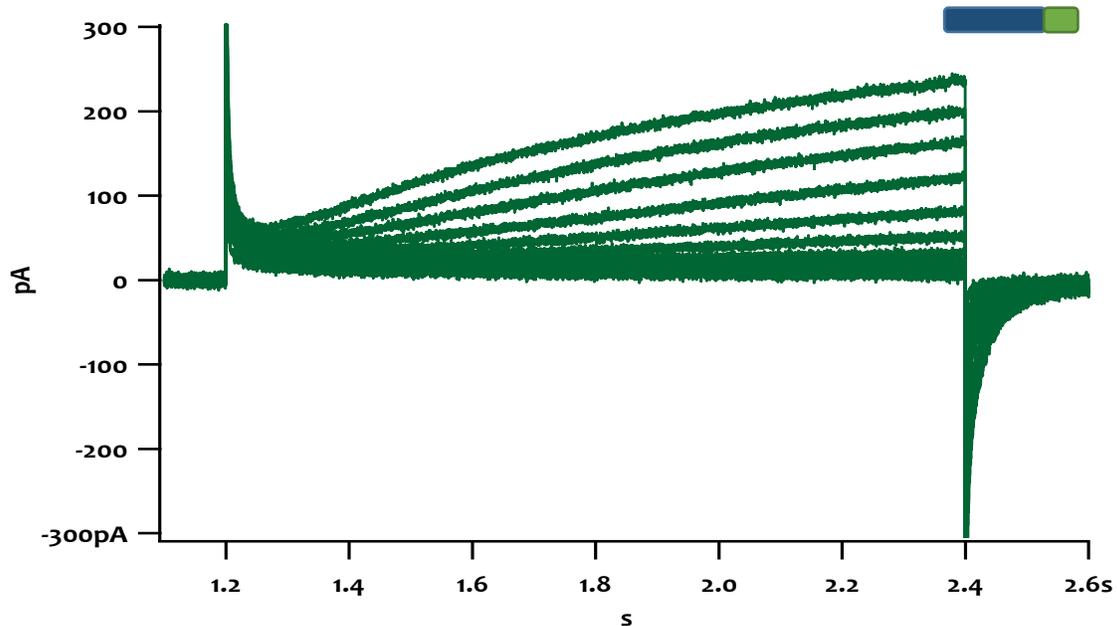


Figura 34. Familia de corrientes de la construcción Hv1-Venus. Los experimentos se realizaron con un $\Delta\text{pH} = 0$

6.3.2.2 Apagamiento de fluorescencia por el movimiento de S4

En el análisis del apagamiento normalizado de esta construcción se observa un mayor error en los datos a pesar de que en principio concuerda con el comportamiento de la construcción Hv1 Δ C-Venus. En los ajustes de las dos Boltzmann se observa que el aporte del apagamiento del VSD es más amplio a comparación del DPA (10%), teniendo una participación en cerca del 90% del apagamiento. Este mismo componente presenta una $V_{1/2} = 119.76 \pm 5.68 \text{ mV}$ (Figura 36). Sin embargo, los errores concedidos por los datos presentan tal variabilidad que no se puede considerar bueno el ajuste de las funciones de Boltzmann.

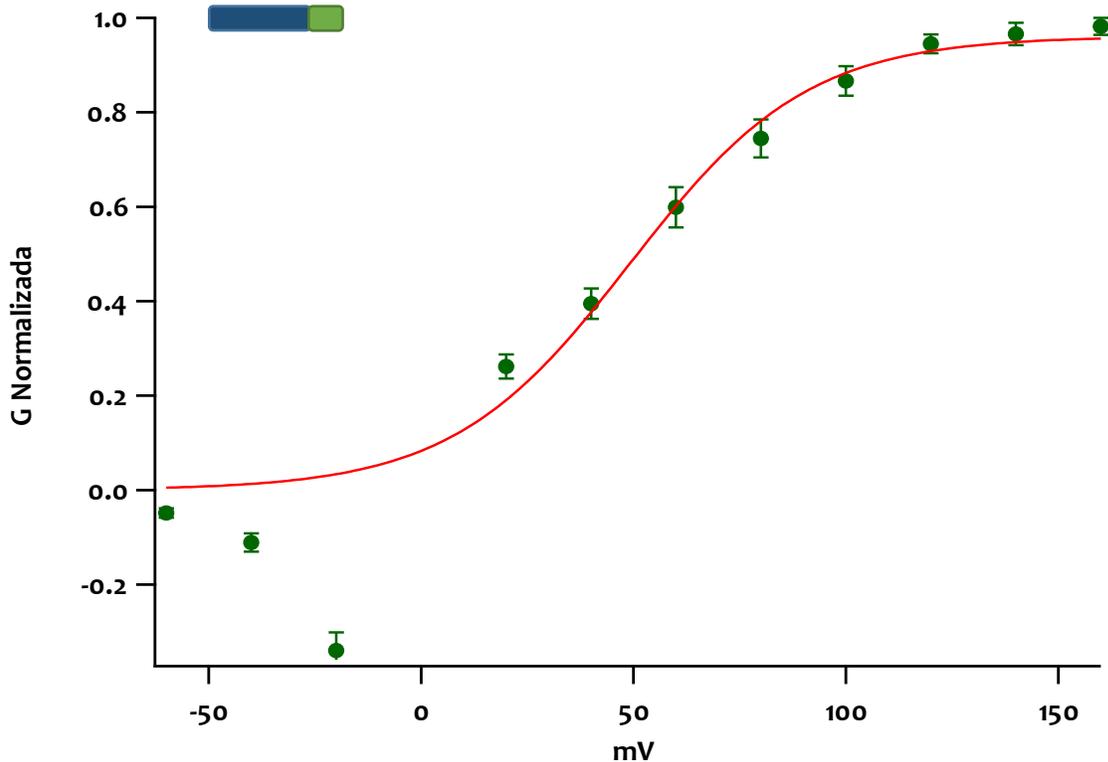


Figura 35. Curva G-V de los canales Hv1-Venus. Se ajustó una función de Boltzmann encontrando una $V_{0.5}=49.22 \pm 9.69$ y una e_0 de 1.19 ± 0.51 . Nótese que en los voltajes cercanos alrededor del potencial de reversión ($V_{rev}=0mV$) la fórmula de Ohm tiende a ser inexacta.

6.3.3 Construcción Hv1-tagRFP

6.3.3.1 Electrofisiología del canal

En lo relativo de la construcción Hv1 y Hv1 Δ C junto con la proteína fluorescente tagRFP, que se eligió debido a tener un pKa de 3.7 lo que nos permitió trabajar con un pH intracelular de 5 y de 7 en la región extracelular (Δ pH=2) sin sufrir un cambio significativo en su fluorescencia como podría suceder con la proteína Venus (véase *Elección de proteínas fluorescentes*).

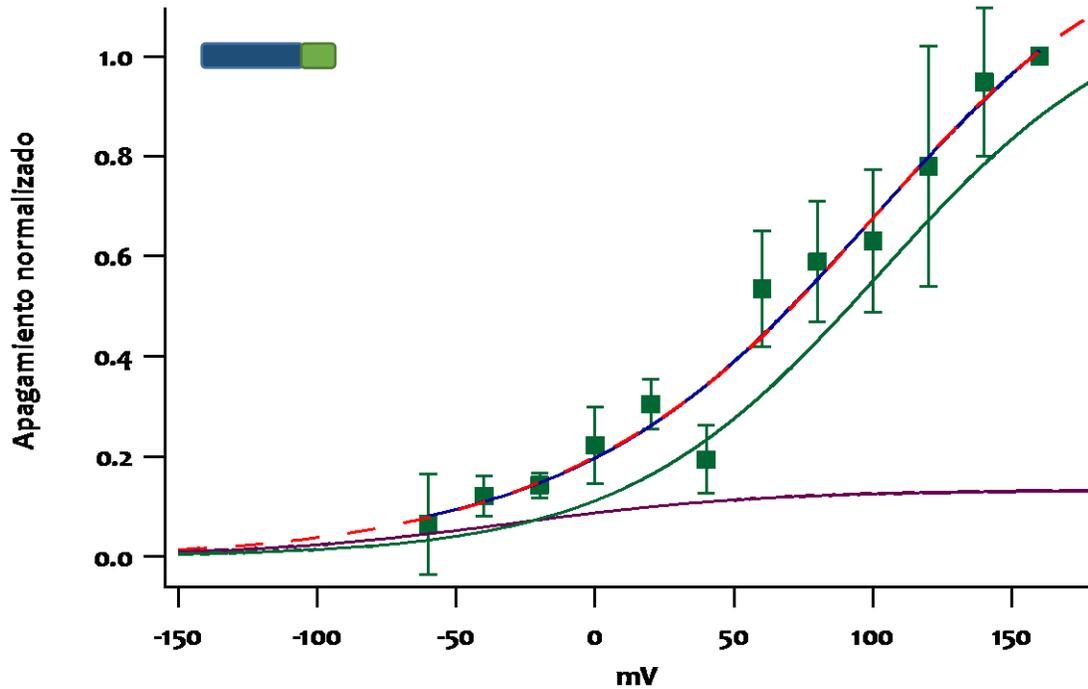


Figura 36. Grafica de apagamiento relativo en función del Voltaje de la construcción Hv1-Venus. Se muestran los datos de fluorescencia de los parches en cada pulso (marcas redondas verdes) junto con el ajuste de Boltzmann obtenido de esos datos (línea azul). También se representa una simulación de los datos siguiendo el mismo ajuste si se hubieran obtenido desde -150 (línea roja interrumpida), y los dos componentes del ajuste por separado: el movimiento relativo al DPA (línea violeta) y del VSD del Hv1 (línea continua verde) con una $V_{1/2}$ de 30 mV y de 119.76 ± 5.68 respectivamente.

Para este trabajo se ha logrado hasta el momento construir y expresar la proteína de fusión Hv1-tagRFP, con el cual se han realizado 8 parches de membrana de ovocito a los cuales se les corrió el protocolo de pulsos prueba de -100mV a 120mV. Con este protocolo se obtuvieron corrientes de protones dentro de un rango de 117-550pA a (Figura 37). Los experimentos ser realizaron con un $\Delta\text{pH}=2$ (pH interno=5, pH externo=7). Como los anteriores casos, se calculó la conductancia con la fórmula de la ley de Ohm, se normalizaron los datos y al ajustarlos a una ecuación Boltzmann se obtuvo una $V_{0.5} = 11.9 \pm 5.58$ y una $e_0 = 0.88 \pm 0.13$ (Figura 38). Los datos de conductancia resultan interesantes ya que presenta características distintas a las construcciones con las que hemos experimentado. En primer lugar, la $V_{0.5}$ no es tan negativa como se esperaría de trabajar un ΔpH de 2 unidades, sino que es ligeramente positiva a pesar de que se puede observar una V_t en un rango de -60 a -40mV. En segundo lugar, la carga elemental e_0 que transporta el canal para abrirse (carga de compuerta) es más pequeña que en las construcciones con Venus ($0.4 e_0$ de

diferencia), haciendo que en su gráfica se observe como un pendiente menos inclinada en comparación a las respectivas gráficas de las otras dos proteínas de fusión aquí estudiadas.

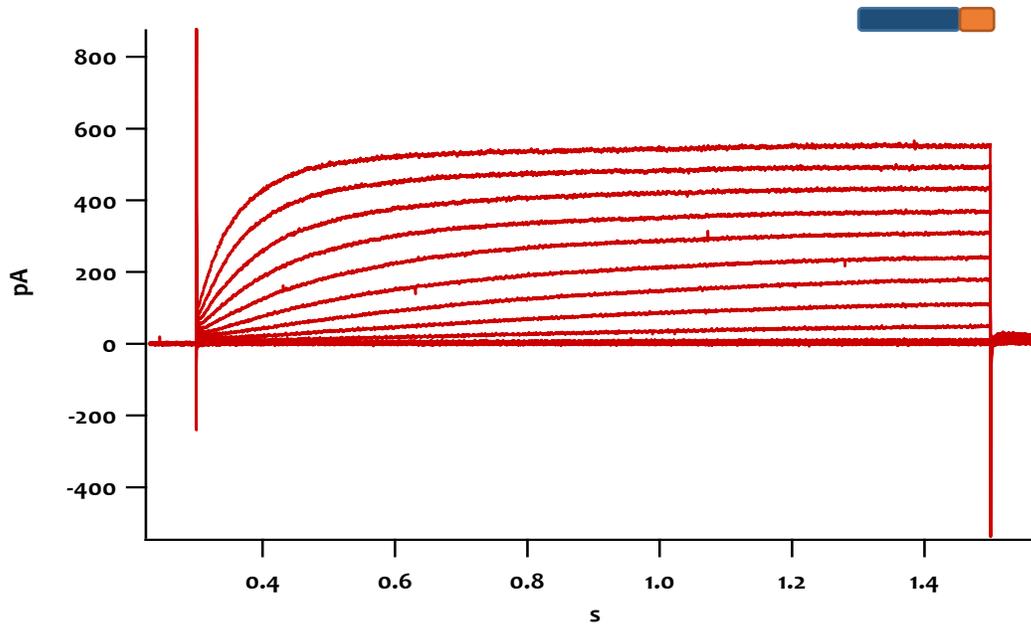


Figura 37. Familia de corrientes de la construcción Hv1-tagRFP. Estos experimentos fueron realizados con un ΔpH de 2 (pH interno = 5 y pH externo = 7)

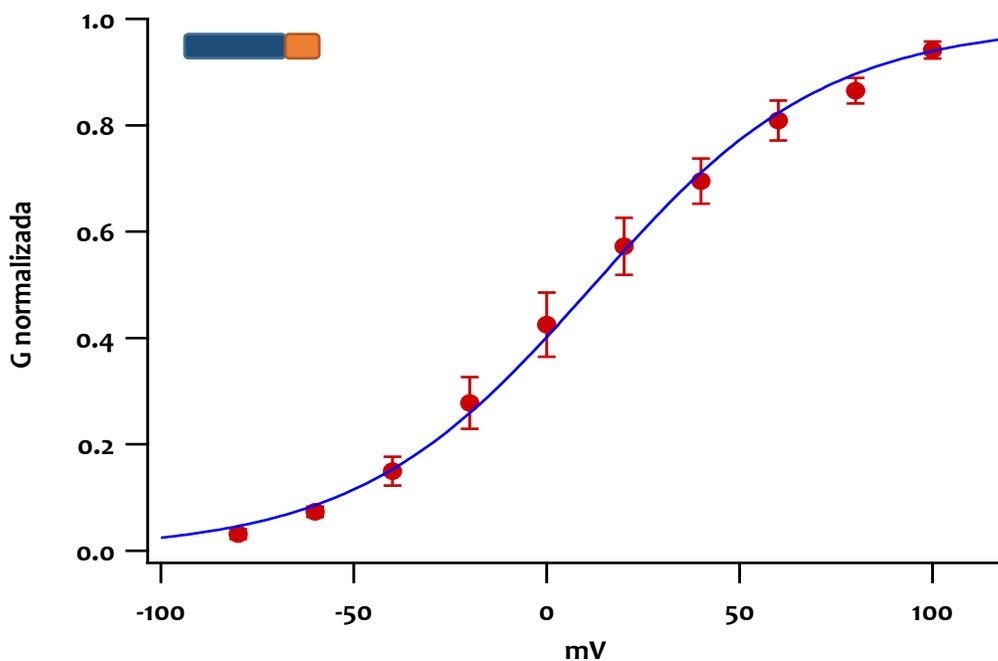


Figura 38. Curva G-V de los canales Hv1-tagRFP. El cálculo de la conductancia se realizó con la ecuación de Ohm. $V_{\text{rev}} = -117\text{mV}$. $\Delta\text{pH} = 2$. Después de ajustar los datos a la función Boltzmann se obtuvo una $V_{0.5} = 11.92 \pm 5.58$ y una e_0 de 0.89 ± 0.14 . Se puede observar como la pendiente se ha horizontalizado, haciendo la conducción más lenta.

Coefficient values \pm one standard deviation

- w_0 = 0.99069 ± 0.0369
- w_1 = 0.82272 ± 0.0837
- w_2 = 11.606 ± 4.07

6.3.3.2 Medición de la fluorescencia

A pesar de obtener corrientes que sobrepasaban la magnitud del límite establecido (más de 50pA en el pulso de 100mV), el nivel de la fluorescencia era muy bajo cuando se aplicaba el protocolo de adquisición de imágenes. Esto se evidenció después de normalizar los datos obtenidos y al momento de aplicar el análisis de apagamiento de la fluorescencia. Se obtuvieron datos con errores amplios, lo que indica que existe una gran variabilidad en la fluorescencia en cada voltaje estudiado. Su amplitud fue tal que no les es posible ajustar la suma de funciones Boltzmann (Figura 39).

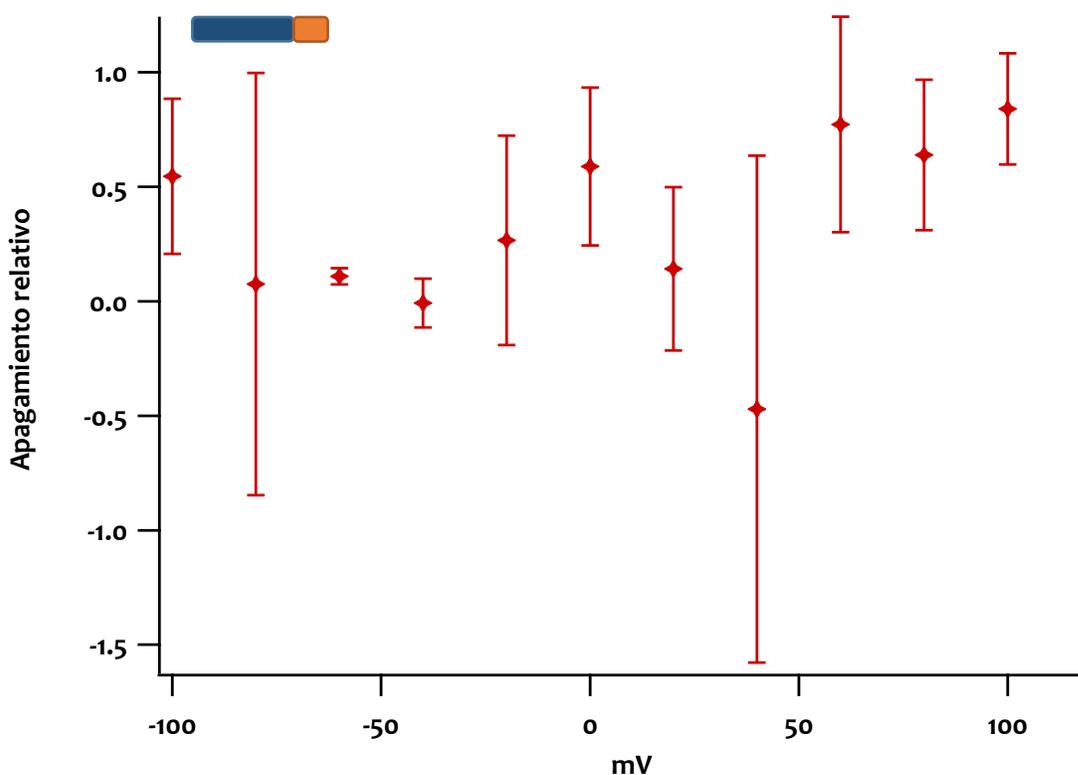


Figura 39. Gráfica de apagamiento relativo en función del Voltaje de la construcción Hv1-tagRFP. Se observa una amplia variabilidad de los datos, por lo que no se puede ajustar la función Boltzmann

7. DISCUSIÓN

7.1 Distancia entre la proteína fluorescente y la membrana.

En este trabajo se propuso medir el movimiento del canal iónico permeable a protones H_{V1} usando la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia. Para poder medir el movimiento, fue necesario valorar la fluorescencia en un estado de donde la membrana no esté siendo sometida a un voltaje que pueda cambiar la posición del DPA y del segmento transmembranal. Esto nos permitió medir de manera previa la distancia entre el fluoróforo de la proteína y la membrana. Los resultados obtenidos con H_{V1} -Venus fueron de una eficiencia de FRET de 37% cuando se agregó el DPA, que son resultados parecidos a los ya previamente obtenidos[48]. En estos experimentos previos se reporta el uso de una proteína diferente a la de este experimento (m-citrine), sin embargo tiene un R_0 igual a la Venus, es decir 3.7 nm. Esto permitió asumir que la distancia en nuestros experimentos es la misma que la que se adquirió en dichos trabajos que fue de 85 Å u 8.5 nm. En concreto sobre la proteína $H_{V1}\Delta C$ -Venus, al momento de la presentación de este trabajo, faltan los resultados experimentales sobre la estimación de eficiencia de FRET con respecto al DPA de la membrana (ver *Perspectivas*), sin embargo se puede asumir que la distancia es aproximadamente de 2.0 nm es la distancia que queda cuando se sustrae la distancia del coiled-coil, valorada en 6.5 nm[6, 31]. También es importante tener en cuenta que la literatura se propone que cuando al canal carece de la estructura coiled-coil se expresa en monómeros[1, 14, 15], por lo que la simulación debería de ajustarse a solo un donador y no a dos como en las construcciones con el canal completo.

Los datos de la eficiencia de FRET entre la proteína H_{V1} -tagRFP y el DPA en la membrana fue de 12%. Dado que la mayor parte de la distancia entre nuestra construcción y la membrana es el coiled-coil del canal, asumimos que el fluoróforo se encuentra a la misma distancia que H_{V1} -Venus ya que la secuencia de aminoácidos del canal está completa, justo como la construcción con Venus. Hasta el momento en que

se escribió este trabajo, no se ha podido calcular la distancia y compararlos con los datos experimentales que confirmen dicha distancia (ver *Perspectivas*). Para la construcción H_{v1}ΔC-tagRFP la eficiencia de FRET al DPA aumentó a 31%, lo cual hace sentido debido a que ahora la estructura coiled-coil no se encuentra, acercando a la proteína fluorescente al DPA y aumentando la transferencia de energía como resultado. De igual manera como en la anterior proteína de fusión, al final de este trabajo no se ha calculado la distancia a partir de la eficiencia de FRET que se obtuvo en los experimentos, sin embargo se puede suponer que es alrededor de 2 nm por las mismas razones que se mencionan arriba (ver *Perspectivas*). Los cálculos en la simulación para obtener la distancia se deberán hacer para ajustarlos a un solo donador por la expresión en monómeros que se describió anteriormente.

7.2 Apagamiento por el movimiento de S₄

Se logró medir un aumento en la eficiencia de transferencia en la construcción H_{v1}ΔC-Venus provocada por el movimiento del S₄ del canal, sitio donde estuvo unida la proteína fluorescente. Cabe mencionar que en estos experimentos la región *coiled-coil* fue removida desde el aminoácido 221, provocando que el fluoróforo de la proteína se acercara más a la membrana.

El apagamiento provocado por el movimiento del S₄ fue del 43% del total de la transferencia de energía. Este porcentaje implica que el S₄ produce un movimiento importante a través de la membrana, de una magnitud aproximada a la de distancia que produce el propio movimiento del DPA, el cual reduce la fluorescencia en un 57%. Sin embargo, el ajuste del apagamiento está normalizado con su propia magnitud, es decir, los datos obtenidos indican cómo se comporta el apagamiento relativo mas no se conoce el porcentaje que provoca este apagamiento con respecto a la fluorescencia absoluta de los parches y por ende la distancia que el S₄ recorre. Es de particular interés que el segundo componente del apagamiento en los experimentos comience a suceder alrededor de los 55mV, que es el voltaje en donde la mitad de los canales

H_{V1}ΔC se han abierto. Esto podría relacionarse con que el apagamiento debido al movimiento del S₄ solo sería notorio cuando se haya superado la V_{0.5} de los canales iónicos, sin embargo es una relación que se debe de confirmar con una mayor cantidad de experimentos y con otros pH para evaluar el comportamiento del segundo componente visto en esta construcción. El hecho de que se encuentre más cerca de la membrana hace probablemente que los cambios de fluorescencia sean más notorios y por ende la estimación sea más precisa que en la construcción H_{V1}-Venus.

En los datos de apagamiento obtenidos por la construcción H_{V1}-Venus, posiblemente movimiento del DPA se encuentra subestimado ya que el éste es responsable del 13% del apagamiento del experimento y en simulaciones previas del comportamiento de los experimentos, el movimiento del DPA reduce hasta aproximadamente el 50% o más de la fluorescencia, por otra parte los errores en la obtención de los datos no permiten un ajuste correcto de la ecuación de Boltzmann. Los valores del apagamiento, a pesar de lo mencionado anteriormente, son consistentes con lo ya mostrado en los experimentos con el canal H_{V1}ΔC-Venus. Se deben realizar parches con ovocitos de mejor expresión además de procurar analizar una mayor área de datos para obtener resultados más analizables.

Para poder confirmar el movimiento del S₄, se volvió necesario que se experimente con la capacidad que tiene el canal de cambiar su voltaje de activación y con esto, se vuelve necesario a su vez cambiar la concentración de hidrogeniones en ambos lados de la membrana. Esta es la razón por la que en este trabajo se buscó usar a la proteína fluorescente tagRFP unida al canal dimérico H_{V1}, sin embargo en los resultados obtenidos, el apagamiento de la fluorescencia no parece relacionarse con ningún tipo de movimiento, ni el de DPA ni el de S₄. No obstante, se debe de revisar el protocolo de la captación de imágenes y la forma de expresión de dicha construcción en la membrana, para descartar errores sistemáticos que puedan estar viciando los resultados. Hay que valorar que la proteína no se está estimulando con su

pico de excitación y que además el filtro con el cual se están recolectando los datos es un “paso banda” que no discriminaría entre la luz de nuestra construcción y la auto fluorescencia del ovocito pudiendo afectar la valoración del movimiento del S4. Se debe de mencionar que en el momento de realizar esta tesis aún no se han logrado parches con la construcción $H_{V1}\Delta C$ -tagRFP, quedando por realizar en la sección de *Perspectivas*.

7.3 Electrofisiología de las construcciones.

Una de las primeras inquietudes que se podrían tener es que la unión de una proteína fluorescente al canal iónico pueda cambiar sus propiedades fisiológicas. En las dos construcciones en donde se unió la proteína fluorescente Venus al canal H_{V1} , ya sea completo o sin coiled-coil, se preservaron las funciones más características del canal. La primera de ellas fue la regulación que tiene el ΔpH sobre el V_t . En ambos canales, la configuración en donde la solución intracelular (baño) como la solución extracelular (pipeta), es decir, $\Delta pH=0$, produce que el canal se active a potenciales positivos con un V_t de 40mV. Esto concuerda con lo reportado en la literatura sobre el cambio del potencial de activación debido a la concentración de hidrogeniones a ambos lados de la membrana.

Otra característica que se nota en las construcciones probadas en este trabajo con la proteína Venus, que es propia del canal H_{V1} es que en los canales en donde no existe el coiled-coil ($H_{V1}\Delta C$) se activan más rápido que los que expresan al canal completo (Figura 40). En el canal truncado, al ajustarse los datos de una corriente a un potencial de 160 mV, se obtuvo una tau invertida de $2.57s^{-1} \pm 0.004$, que se traduce en una constante de activación 0.388 segundos. En comparación, la exponencial ajustada al canal dimérico bajo el mismo potencial presentó una tau invertida de 1.10 ± 0.01 s, es decir una constante de activación de 0.904 segundos⁻¹. Esto concuerda con la literatura donde se ha reportado esta diferencia de velocidades de activación entre este canal en dímero (canal con el coiled-coil) y en su presentación en monómero (canal sin el coiled-coil)[5, 12, 21].

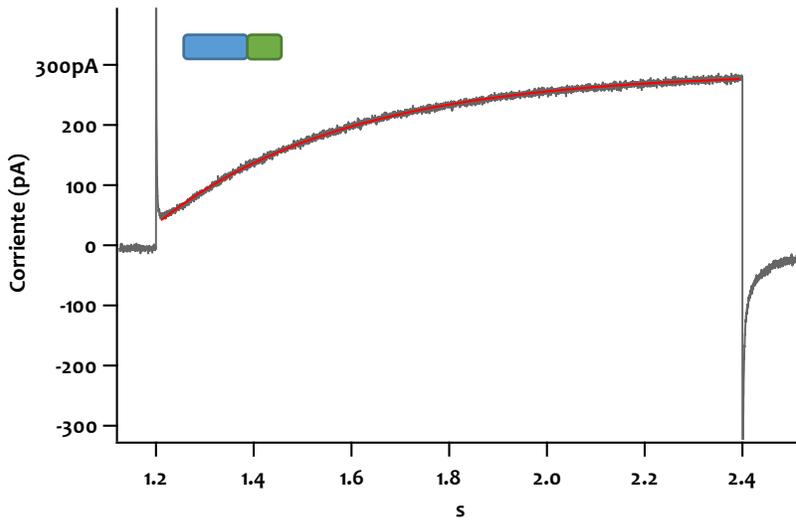
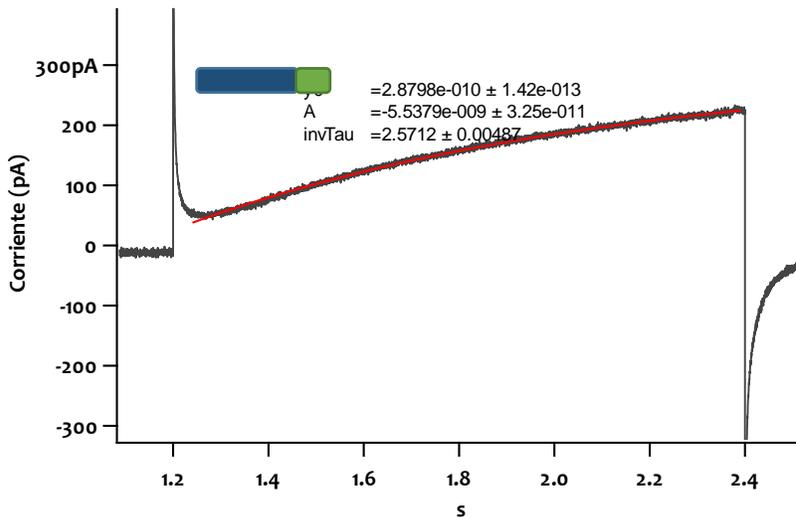


Figura 40. Estimación de la velocidad de activación de los canales $H_V1\Delta C$ y H_V1 . Se tomaron las corrientes máximas de las familias de corriente expuestas en este trabajo en las figuras 31 y 34 a las cuales se les ajusto una exponencial para determinar el tiempo de activación. A. $H_V1\Delta C$ arrojó una Tau invertida = $2.57 \text{ s}^{-1} \pm 0.00487$ que otorga una constante de activación de 0.388s B. H_V1 arrojó una Tau invertida = $1.10 \text{ s}^{-1} \pm 0.01$ que otorga una constante de activación de 0.904s.



Hasta el momento se han comentado algunas de las características electrofisiológicas de las construcciones del canal junto con la proteína fluorescente Venus, sin embargo estas particularidades difieren con los resultados obtenidos con la construcción del canal H_V1 y la proteína fluorescente tagRFP. Dicha construcción al parecer se comporta diferente. A pesar de que su V_t es de alrededor de -60mV , situación que se esperaría a un $\Delta\text{pH} = 2$ concordando con la propiedad descrita con la literatura[19, 36], parece que tiene una conductancia menor ya que alcanza su $V_{0.5}$ hasta los 11.9 mV haciendo que el cálculo de e_0 sea menor al encontrado en las otras dos construcciones, de 0.88 en tagRFP a 1.2 en las proteínas de fusión con Venus. Antes

de llegar a la conclusión de que la fusión con tagRFP cambia el comportamiento del canal, se debe de valorar las características del experimento de donde se adquirieron los datos. Revisando las diferencias con los experimentos de las otras dos proteínas de fusión, una de las más notables es la diferencia de concentración de hidrogeniones. En los experimentos de la proteína H_{v1}-tagRFP existía una diferencia de concentración de hidrogeniones de dos órdenes magnitud a través de la membrana. Además la cantidad de buffer en las soluciones a ambos lados de la membrana es de 10mM. Estas dos cualidades de las soluciones en donde se hicieron los experimentos podrían hacer que el control de pH sea insuficiente después de las rápidas corrientes de hidrogeniones al activarse el canal, provocando que después de cada pulso prueba la fuerza electroquímica de la cual depende la activación del canal reduzca y a su vez, reduzca la conductividad del canal. Por lo anteriormente descrito, se deben de replantear los experimentos con una mayor concentración de buffer, aumentando 10 veces su concentración (100mM), para poder tener un mejor control de pH a través de los pulsos del experimento.

Es importante mencionar que la elección de medir la conductancia con la ley de Ohm, a pesar en sus inexactitudes implicadas en la estimación de la conductancia cuando las corrientes pequeñas y cuando el voltaje es cercano al potencial de reversión, podría ser la más aceptable. Hay otros métodos implican la medida del tamaño de las colas de corriente al momento de cerrar el canal como una forma de estimar la conductancia, esto porque como el canal se encuentra abierto previamente, la cantidad de corriente al cierre describirá de manera proporcional cuantos canales se encuentran abiertos y como conduce el poro del canal iónico. Sin embargo, el canal H_{v1} al activarse reduce la concentración de hidrogeniones en un medio local a una velocidad tan alta que cambia la fuerza electroquímica alrededor del canal, produciendo que las colas de corriente al cierre de los canales no estén bajo las mismas las fuerzas electroquímicas que al inicio del experimento, por ende, éstas no reflejaran correctamente el comportamiento del canal.

Cuando se estima la conductancia a través de la ecuación de Ohm se puede observar en las gráficas G contra V (Figuras 28 y 31) que a potenciales negativos previos a la apertura del canal los datos se colocan como si existiera una conductancia “negativa”, éste efecto es producido por el cálculo donde la corriente inexistente o cercana a cero se divide entre la negatividad del potencial del pulso (como el potencial de reversión es cero, la corriente se divide solamente por el del pulso prueba), resultando en una conductancia aparentemente negativa. Cabe señalar que no existen las conductancias negativas ya que el valor de cero significa que el canal no conduce y por lo tanto no hay datos menores.

8. CONCLUSIONES

- El FRET es una herramienta adecuada para medir movimientos perpendiculares de los segmentos de los canales cuando éstos se activan por voltaje.
- La técnica de Patch-Clamp Fluorometry es una herramienta útil para investigar los cambios conformacionales dependientes de activación del canal HV_1 y $HV_1\Delta C$
- La unión de proteínas fluorescentes al canal HV_1 y $HV_1\Delta C$ no se interponen en el funcionamiento del canal.
- Se pudo estimar el movimiento del S_4 del canal es de manera perpendicular en la activación del canal.

9. PERSPECTIVAS

Al momento de escribir este documento quedan por realizar experimentos que constaten el movimiento del S₄ del canal H_{V1} a través de la membrana, los cuales se resumen en los siguientes puntos:

- Calcular la distancia entre el fluoróforo de Venus y tagRFP con respecto a la membrana celular colocando DPA intramembranal y valorando de eficiencia de FRET.
- Estandarizar la cantidad de buffer en las soluciones con las que se hacen los experimentos para mantener fijo el pH durante el desarrollo de los mismos.
- Expresar la proteína de fusión H_{V1}ΔC-tagRFP en membranas de ovocitos para realizar los experimentos de Patch-Clamp Fluorometry con el DPA.
- Realizar protocolos experimentales que varíen el pH lo suficiente para cambiar el voltaje de activación del canal y así, evaluar las características del segundo componente de apagamiento de la fluorescencia y su posible relación con el movimiento del S₄.
- Aumentar la n de los experimentos de Patch-Clamp Fluorometry en cada una de las construcciones aquí descritas. Lo que nos permitirá conocer de cerca el comportamiento del S₄ durante la activación del canal. Y al final, comparando con la fluorescencia absoluta del parche, se podrá establecer un rango de movimiento del S₄ a través de la membrana lipídica.
- Aumentar la cantidad de construcciones colocando la proteína fluorescente en el N-Terminal y verificar si éste presenta un cambio conformacional también.
- Realizar los experimentos de anisotropía de las construcciones para valorar cuanto comprometen las medidas de eficiencia de FRET.

Una de las consideraciones futuras de este trabajo es tratar de desarrollar estrategias experimentales con las cuales se pueda medir los cambios conformacionales de este canal a través de sondas fluorescentes que puedan

inmiscuirse dentro de su secuencia, como los aminoácidos no naturales, que al ser más pequeños que las proteínas fluorescentes su R_0 también lo es, propiciando que se puedan obtener estudios más precisos sobre los movimientos que activan al HIV.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. DeCoursey, T.E., *Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(2): p. 599-652.
2. Dudev, T., et al., *Selectivity Mechanism of the Voltage-gated Proton Channel, HV1*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10320.
3. Porto-Andión, A. *Membrane Transport*. Curso de Biología 2013 [cited 2013 05-march-2016];
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MembraneTransport.png>].
4. Hebert, J.T. *Membrane Transport*. Cell membrane transport 2008 [cited 2016 march 5th];
http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/ECB/CH12/12_22.jpg].
5. DeCoursey, T.E. and J. Hosler, *Philosophy of voltage-gated proton channels*. *J R Soc Interface*, 2014. **11**(92): p. 20130799.
6. Takeshita, K., et al., *X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(4): p. 352-7.
7. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. ed. 2001, Sunderland, Mass. ; [Great Britain]: Sinauer.
8. Zheng, J.e. and M.C.e. Trudeau, *Handbook of ion channels*.
9. Ramsey, I.S., et al., *A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain*. *Nature*, 2006. **440**(7088): p. 1213-6.
10. Sasaki, M., M. Takagi, and Y. Okamura, *A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel*. *Science*, 2006. **312**(5773): p. 589-92.
11. Pupo, A., et al., *Proton channel models filling the gap between experimental data and the structural rationale*. *Channels (Austin)*, 2014. **8**(3): p. 180-92.
12. DeCoursey, T.E., *The Voltage-Gated Proton Channel: A Riddle, Wrapped in a Mystery, inside an Enigma*. *Biochemistry*, 2015. **54**(21): p. 3250-68.
13. Kulleperuma, K., et al., *Construction and validation of a homology model of the human voltage-gated proton channel hHV1*. *J Gen Physiol*, 2013. **141**(4): p. 445-65.

14. Musset, B. and T. Decoursey, *Biophysical properties of the voltage gated proton channel H(V)1*. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 2012. **1**(5): p. 605-620.
15. Smith, S.M. and T.E. DeCoursey, *Consequences of dimerization of the voltage-gated proton channel*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **117**: p. 335-60.
16. Hondares, E., et al., *Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(50): p. 18078-83.
17. Musset, B., et al., *Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5117-21.
18. Wang, Y., et al., *Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 protein overexpression in breast cancer*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13877-88.
19. Cherny, V.V., et al., *Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement*. J Gen Physiol, 2003. **121**(6): p. 615-28.
20. Decoursey, T.E., *Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 475-579.
21. DeCoursey, T.E., et al., *Insights into the structure and function of HV1 from a meta-analysis of mutation studies*. J Gen Physiol, 2016. **148**(2): p. 97-118.
22. Akaike, N., et al., *Permeability to various cations of the voltage-dependent sodium channel of rat single heart cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1984. **228**(1): p. 225-9.
23. Barry, P.H., *The reliability of relative anion-cation permeabilities deduced from reversal (dilution) potential measurements in ion channel studies*. Cell Biochem Biophys, 2006. **46**(2): p. 143-54.
24. Ramsey, I.S., et al., *An aqueous H⁺ permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(7): p. 869-75.
25. Li, Q., et al., *Resting state of the human proton channel dimer in a lipid bilayer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(44): p. E5926-35.

26. Musset, B., et al., *Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel*. *Nature*, 2011. **480**(7376): p. 273-7.
27. Goodchild, S.J., et al., *Basis for allosteric open-state stabilization of voltage-gated potassium channels by intracellular cations*. *J Gen Physiol*, 2012. **140**(5): p. 495-511.
28. Cherny, V.V., V.S. Markin, and T.E. DeCoursey, *The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient*. *J Gen Physiol*, 1995. **105**(6): p. 861-96.
29. DeCoursey, T.E. and V.V. Cherny, *Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells*. *J Physiol*, 1995. **489** (Pt 2): p. 299-307.
30. Smith, S.M., et al., *Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(44): p. 18162-7.
31. Li, S.J., et al., *The role and structure of the carboxyl-terminal domain of the human voltage-gated proton channel Hv1*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(16): p. 12047-54.
32. Tombola, F., et al., *The opening of the two pores of the Hv1 voltage-gated proton channel is tuned by cooperativity*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(1): p. 44-50.
33. Tombola, F., M.H. Ulbrich, and E.Y. Isacoff, *The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor*. *Neuron*, 2008. **58**(4): p. 546-56.
34. Gonzalez, C., et al., *Molecular mechanism of voltage sensing in voltage-gated proton channels*. *J Gen Physiol*, 2013. **141**(3): p. 275-85.
35. Musset, B., et al., *Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 9): p. 1435-49.
36. Cherny, V.V. and T.E. DeCoursey, *pH-dependent inhibition of voltage-gated H(+) currents in rat alveolar epithelial cells by Zn(2+) and other divalent cations*. *J Gen Physiol*, 1999. **114**(6): p. 819-38.
37. Capasso, M., et al., *HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(3): p. 265-72.

38. DeCoursey, T.E., *Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(1): p. 27-40.
39. DeCoursey, T.E., *The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 194-218.
40. Schilling, T., et al., *Voltage-activated proton currents in human lymphocytes*. *J Physiol*, 2002. **545**(Pt 1): p. 93-105.
41. Wu, L.J., et al., *The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(4): p. 565-73.
42. Morgan, D., et al., *Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(42): p. 18022-7.
43. Eder, C. and T.E. DeCoursey, *Voltage-gated proton channels in microglia*. *Prog Neurobiol*, 2001. **64**(3): p. 277-305.
44. Barnett, L., et al., *A fluorescent, genetically-encoded voltage probe capable of resolving action potentials*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e43454.
45. Takanishi, C.L., et al., *GFP-based FRET analysis in live cells*. *Brain Res*, 2006. **1091**(1): p. 132-9.
46. Taraska, J.W. and W.N. Zagotta, *Fluorescence applications in molecular neurobiology*. *Neuron*, 2010. **66**(2): p. 170-89.
47. Nagai, T., et al., *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(1): p. 87-90.
48. De-la-Rosa, V., et al., *Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(41): p. 29506-17.
49. Goldin, A.L., *Maintenance of Xenopus laevis and oocyte injection*. *Methods Enzymol*, 1992. **207**: p. 266-79.
50. Kusch, J. and G. Zifarelli, *Patch-clamp fluorometry: electrophysiology meets fluorescence*. *Biophys J*, 2014. **106**(6): p. 1250-7.

51. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. ed. 2006, New York: Springer.
52. Vogel, S.S., C. Thaler, and S.V. Koushik, *Fanciful FRET*. *Sci STKE*, 2006. **2006**(331): p. re2.
53. Vogel, S.S., B.W. van der Meer, and P.S. Blank, *Estimating the distance separating fluorescent protein FRET pairs*. *Methods*, 2014. **66**(2): p. 131-8.
54. Chanda, B., et al., *Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement*. *Nature*, 2005. **436**(7052): p. 852-6.
55. Wang, D., et al., *Improved probes for hybrid voltage sensor imaging*. *Biophys J*, 2010. **99**(7): p. 2355-65.
56. De la Rosa-Jiménez, V., *Estudio Funcional y Estructural de Canales TRP*, in *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas*. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 93.
57. Broeke, J.a., J.M.M.a. Perez, and J.a. Pascau, *Image Processing with ImageJ - Second Edition*. Second edition. ed.
58. Lambert, T. and K. Thorn. *Fluorescent Protein Propierties*. 2015 [cited 2016 02 Feb 2016]; Creative commons:[<http://nic.ucsf.edu/FPvisualization/>].
59. Merzlyak, E.M., et al., *Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime*. *Nat Methods*, 2007. **4**(7): p. 555-7.
60. Ottolia, M., K.D. Philipson, and S. John, *Xenopus oocyte plasma membrane sheets for FRET analysis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(4): p. C1519-22.
61. Evrogen. *Red Fluorescent Protein tagRFP*. 2002-2016 [cited 2016 januaru 2016]; Evrogen:[http://evrogen.com/products/TagRFP/TagRFP_Detailed_description.shtml].