



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**INTERACTOMA DEL CANAL DE POTASIO GIRK5 DE LOS OVOCITOS
DE LA RANA *XENOPUS LAEVIS*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
KARLA ALEJANDRA CHÁVEZ GARCÍA**

**TUTOR-DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ**

**ASESORES PRINCIPALES:
M. EN C. CAROLINA SALVADOR HERNÁNDEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**

VOCAL: **Profesor: Leonila Irma Laura Escobar Pérez**

SECRETARIO: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**

2º SUPLENTE: **Profesor: Javier Axosco Marín**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 510 DEL EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

M. EN C. CAROLINA SALVADOR

SUSTENTANTE:

KARLA ALEJANDRA CHÁVEZ GARCÍA

Agradecimientos.

A mi tutora de tesis la Dra. Laura Escobar por asesorar el desarrollo de mi tesis, y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A los miembros del jurado, por sus observaciones para la corrección del presente trabajo:

PRESIDENTE:	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL:	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
SECRETARIO:	Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
1er. SUPLENTE:	Dr. Samuel Canizales Quinteros
2° SUPLENTE:	Dr. Javier Axosco Marín

Por su apoyo técnico:

M. en C. Rangel García Claudia Iveth
M. en C. Carolina Salvador Hernández.
Dra. Zinaeli López González
Dr. Daniel Aparicio León
Dra. Guadalupe Teresa Padilla Flores

Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en el laboratorio de canales iónicos (lab. 510), del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la UNAM, A través de la DGAPA. La clave del proyecto es IN224919 "Participación de los canales de potasio GIRK5 en la maduración de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*".

Índice

1. Abreviaturas	7
2. Índice de figuras	10
3. Índice de tablas	12
4. Resumen	13
5. Antecedentes	14
5.1. Canales iónicos	14
5.1.1. Canales de potasio (K ⁺)	14
5.1.2. Canales de K ⁺ rectificadores entrantes (Kir)	15
5.2. Receptores acoplados a las proteínas G	16
5.3. Proteína G	17
5.4. Subfamilia Kir3 (GIRK)	19
5.4.1. Canal GIRK5 (Kir 3.5)	20
5.5. <i>Xenopus laevis</i> (Xl)	20
5.6. Proteómica	21
5.6.1. Tipos de proteómica	22
5.6.1.1. Tipos de proteómica no dirigida	23
5.7. Bioinformática	24
5.8. Interactoma	25
6. Objetivos	25
6.1. General	25
6.2. Particulares	25
7. Hipótesis	25
8. Procedimiento experimental.	26
	4

8.1. Transcripción <i>in vitro</i>	26
8.2. Obtención y manejo de los ovocitos	27
8.3. Microinyección del RNA en los ovocitos	28
8.4. Homogenado celular	28
8.5. Cuantificación de proteínas (Método Lowry)	28
8.6. Inmunoprecipitación	29
8.6.1. Preparación de perlas	29
8.6.2. Preaclarado de las muestras	29
8.6.3. Formación del complejo inmune	29
8.6.4. Inmunoprecipitación	29
8.7. Electroforesis y Western Blot (Inmunodetección indirecta)	30
8.8. Tinción con azul de coomassie	30
8.9. Preparación de la muestra para su análisis proteómico	31
8.10. Proteómica	31
9. Resultados y discusión	32
9.1. Transcripción <i>in vitro</i>	32
9.2. Inmunoprecipitación	34
9.3. Análisis proteómico	35
9.3.1. Canal GIRK5-EGFP	36
9.3.2. Canal GIRK5Y16A-EGFP	44
9.4. Proteínas encontradas en ambas muestras	53
9.5. Proteínas que interactúan con el canal GIRK5 en la rana <i>Xenopus tropicalis</i> reportadas hasta el momento	54
9.6. Discusión general	55

10. Conclusiones	56
11. Perspectivas	56
11.1. Para el canal GIRK5	56
11.2. Para el canal GIRK5Y16A	57
12. Referencias	58
13. Anexo de protocolos	64
13.1 Transcripción <i>in vitro</i>	64
13.2 Cuantificación de proteínas.	65
13.3 Preparación de solución ND96 sin calcio.	66
13.4 Preparación de buffer de extracción de proteínas	66
13.5 Preparación de buffer de lavado	67
13.6 Preparación de buffer salino tris (TBS) 5X	67
13.7 Preparación de solución de bloqueo	67
13.8 Preparación de geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor para electroforesis	67
13.9 Preparación de disoluciones para electroforesis	68
13.9.1 Preparación de buffer para electroforesis 5x (SDS-Tris-glicina)	68
13.9.2 Preparación de buffer de transferencia para preparar 1L	69
13.10 Revelado del Western Blot	69
13.10.1 Preparación del reactivo Quimioluminiscente.	69

1. Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ABC	Bicarbonato de amonio
ACN	Acetonitrilo
Ag	Agonista
ATP	Adenosín trifosfato
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E_k	Potencial de equilibrio para el ion potasio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente
GDP	Guanosín difosfato
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante activado por la p
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
HUGO	Organización del genoma humano
IAA	Iodoacetamida

Ip	Inmunoprecipitado
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
Kir	Canal de potasio rectificador entrante
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
LaNSE	Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales
μL	Microlitro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
ng	Nanogramo
nL	Nanolitro
nm	Nanómetro
PPI	Interacciones proteína-proteína
RAPG	Receptor acoplado a proteína G
Rcf	Fuerza centrífuga relativa
RE	Retículo endoplásmico

RNA	Revoluciones por minuto
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Tris, borato y EDTA
TBS	Buffer salino tris
TM	Transmembranal
V	Volt
WT	Tipo silvestre
<i>XI</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Y	Tirosina
2D-PAGE	Gel de poliacrilamida de dos dimensiones

2. Índice de figuras

- Figura 1: Topología de los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir). Los cilindros representan los segmentos TM (2TM) y la región formadora de poro se representa como un bucle por encima (1P). 16
- Figura 2: Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Los cilindros representan los 7 dominios transmembranales. El extremo N-terminal, junto con tres bucles, se encuentran en el exterior celular, mientras que el extremo C-terminal y otros tres bucles, se encuentran en el citosol. Tomada del siguiente enlace:
<http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/GPCRs.html>, el 19 de septiembre de 2019 (14). 17
- Figura 3. Vía de señalización de las proteínas G α i/G α 0. Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005 (17). 18
- Figura 4: Ovocito de *Xenopus laevis*. En A se representan los procesos de transcripción *in vitro* y traducción, dando lugar a una proteína de membrana madura. B esquema que muestra tanto al polo vegetal como animal del ovocito, así como los organelos que lo constituyen. 21
- Figura 5: Mapa del vector PBF EGFP-GIRK5. De color verde se presenta la secuencia que pertenece a la proteína EGFP-C1 y en rosa, la secuencia del canal GIRK5, además se muestran los sitios de unión de algunas enzimas de restricción. 27
- Figura 6: ARN obtenido de la transcripción *in vitro*. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular. El carril 2 y 3 corresponden al ARN del canal GIRK5- EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, respectivamente, con un peso aproximado de 2.3 kb. 33
- Figura 7. Resultados de la inmunoprecipitación 34
- Figura 8. Diagrama de Venn de las proteínas obtenidas después de la aplicación de los filtros a los resultados del análisis proteómicos. 35
- Figura 9: Interactoma del canal GIRK5- EGFP en ovocito de la rana *Xenopus laevis* 36
- 10

Figura 10. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las funciones moleculares de las 12 proteínas detectadas y son agrupadas en las siguientes categorías: unión, actividad catalítica, actividad estructural molecular y actividad transportadora.	38
Figura 11. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran los procesos biológicos en los que están involucradas las 12 proteínas detectadas y son agrupadas en las siguientes categorías: proceso celular, localización, proceso metabólico, respuesta a estímulos y biogénesis.	39
Figura 12. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las clases de proteínas que fueron detectadas: proteínas de unión a ácido nucleico, proteínas transportadoras, hidrolasas, proteínas de citoesqueleto y chaperonas.	40
Figura 13. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las vías de señalización en las que están involucradas las proteínas detectadas	41
Figura 14: Interactoma del canal GIRK5Y16A- EGFP en ovocito de la rana <i>Xenopus laevis</i> .	44
Figura 15. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las funciones moleculares de las 27 proteínas detectadas, agrupadas en las siguientes categorías: unión, actividad catalítica, actividad estructural molecular y actividad transportadora.	47
Figura 16. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran los procesos biológicos en los que están involucradas las 27 proteínas detectadas, agrupadas en las categorías: biogénesis, proceso celular, localización, proceso metabólico y respuesta a estímulos.	48
Figura 17. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las clases de proteínas que fueron detectadas	49
Figura 19. Diagrama de Venn donde se muestra el número de proteínas encontradas en el inmunoprecipitado del canal GIRK5- EGFP (círculo azul) y del canal GIRK5Y16A- EGFP (en rosa pálido).	53

Figura 20. Interactoma del canal GIRK5 de la rana *Xenopus tropicalis* obtenido con el programa String

54

3. Índice de tablas

Tabla 1. Nombre asignado por STRING, gen ID y descripción de las 12 proteínas identificadas en el análisis proteómico, que inmunoprecipitaron con el canal GIRK5-EGFP.

El nombre del gen es el que se representa en el interactoma (Figura 9). 37

Tabla 2. Nombre asignado por STRING, gen ID y descripción de las 27 proteínas identificadas en el análisis proteómico, que fueron inmunoprecipitadas con el canal GIRK5Y16A- EGFP. El nombre del gen, es el que se presenta en el interactoma (figura 14).

45

4. Resumen

En células eucariotas, el canal GIRK5 pertenece a una familia de canales de potasio rectificadores entrantes, que se activan por efecto de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Gi heterotrimérica. Estos canales iónicos se caracterizan por permitir el influjo de potasio en la membrana plasmática y, en consecuencia, determinan el potencial de membrana en reposo, e inhiben la excitabilidad celular. Los canales GIRK forman un poro por el que se transporta potasio. El canal GIRK5 se encuentra expresado endógenamente en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

En estudios previos se ha concluido que los procesos de fosforilación y desfosforilación de la tirosina Y16 del canal GIRK5 determinan su localización. Además de que la localización del canal GIRK5 juega un papel importante en la maduración de los ovocitos de *Xl*.

El objetivo de este trabajo fue obtener los interactomas del canal en sus dos localizaciones (retículo endoplásmico y membrana plasmática), para identificar las proteínas que interactúan con el canal GIRK5 y el canal GIRK5Y16A para dilucidar una posible vía por la que el canal participa en la maduración del ovocito, además de estudiar la posible vía de tráfico celular.

Se sobreexpresaron los canales GIRK5 y GIRK5Y16A en dos grupos de ovocitos y, mediante lisis celular y centrifugación, se obtuvieron las fracciones de membranas totales que contienen dichos canales. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y electroforesis de una dimensión en un gel de poliacrilamida para obtener los inmunoprecipitados de ambos canales, se fragmentaron las proteínas inmunoprecipitadas para la obtención de péptidos que, posteriormente fueron analizados mediante UPLC acoplado a espectrómetro de masas. Por último, con la ayuda de programas bioinformáticos se obtuvieron los interactomas de ambos canales.

Se identificaron 96 proteínas en el inmunoprecipitado del canal GIRK5 y 378 proteínas para el canal GIRK5Y16A con el programa ProteinLynx Global SERVER v3.0.3 software (Waters).

5. Antecedentes

5.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de iones inorgánicos hacia el interior o exterior de la membrana (1). La excitabilidad de las neuronas, el músculo y las células cardíacas depende de la actividad de los canales iónicos. En los epitelios los canales iónicos participan en la reabsorción y excreción de sales de sodio y potasio, respectivamente.

El paso de los iones por los canales es a través de un poro (región P), en el cual se encuentra un filtro de selectividad que le confiere al canal la capacidad de discriminar entre distintos iones, así como regular su velocidad. Cada canal iónico permite el transporte preferente de un tipo de ion: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloruro (Cl^-), principalmente (2).

La apertura del poro ocurre en respuesta a un estímulo específico. Los principales tipos de estímulos son: cambios en el voltaje a través de la membrana (canales regulados por voltaje), estrés mecánico (canales regulados mecánicamente) o la unión de un ligando (canales regulados por ligando). El ligando puede ser un mediador extracelular de receptores ligados a enzimas (canales regulados por fosforilación), actuar específicamente como un neurotransmisor (canales regulados por transmisor) o por un nucleótido (canales regulados por nucleótidos) (2,3).

5.1.1. Canales de potasio (K^+)

Los canales de K^+ representan el grupo más numeroso, heterogéneo y ubicuo de proteínas estructurales de membrana; están presentes en células excitables y no excitables. En las células excitables, la apertura de los canales de K^+ facilita la salida de este catión a favor de su gradiente electroquímico y juega un papel crítico en el mantenimiento del potencial de

membrana en reposo, la frecuencia de disparo de las células automáticas, el patrón y duración de los potenciales de acción, la liberación de neurotransmisores y hormonas, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular.

Los canales de potasio están formados por cuatro subunidades α . Dicha subunidad es la responsable de la conducción de K^+ a través de la bicapa lipídica y se divide en cuatro clases principales, dependiendo del número de dominios transmembranales (TM) y poros (P) que posee: 2TM/1P, que incluye a los canales rectificadores entrantes (Kir), 4TM/2P llamados “canales de fondo o fuga”, 6TM/1P a los que pertenecen los canales dependientes de voltaje (Kv) y los canales dependientes de calcio y 8TM/2P, que incluye los canales de potasio rectificadores salientes (4). Los canales de K^+ son homo o heterotetrámeros (5).

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

El papel fisiológico de los canales Kir (Inward-rectifier potassium channel) es mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ion K^+ (E_k); por tanto, regulan la excitabilidad celular, la secreción de insulina, controlan la frecuencia cardíaca, modulan la transmisión sináptica, el tono vascular y mantienen el balance electrolítico (6, 7).

Solo los canales Kir3 o GIRK se modulan en forma indirecta por receptores acoplados a proteínas G_i sensibles a hormonas y neurotransmisores (2). También son regulados por elementos intracelulares y membranales: nucleótidos cíclicos, fosfolípidos, ATP, cinasas, el pH, lípidos, entre otros (6, 8).

Los canales tipo Kir, son llamados así, porque cuando se encuentran en su estado abierto permiten el movimiento iónico siempre a favor de su potencial electroquímico, y al ser rectificadores son de dirección única, es decir, que preferentemente permiten el movimiento del ion en un sentido y no en el otro (9, 10) Esta clase de canales está

compuesto por dos dominios transmembranales M1 y M2, y una región P (2TM/1P); su estructura se representa en la figura 1 (4).

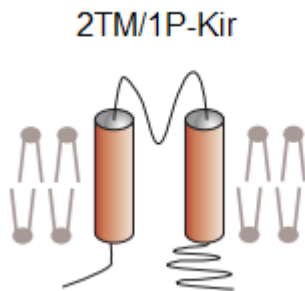


Figura 1: Topología de los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir). Los cilindros representan los segmentos TM (2TM) y la región formadora de poro se representa como un bucle por encima (1P). Modificada de Bigging et al, 2000 (4).

Esta familia de canales está formada por 7 subfamilias: Kir1.x - Kir7x. Se encuentran localizados en una amplia variedad de células tanto excitables como no excitables: cardiomiocitos, neuronas, osteoclastos, leucocitos, células endoteliales y epiteliales, células de la glía, de músculo liso, riñón y ovocitos (11).

La organización del genoma humano (HUGO) asignó la nomenclatura KCNJ para los canales Kir.

5.2. Receptores acoplados a las proteínas G

Los receptores acoplados a las proteínas G (RAPG) pertenecen al grupo más grande y diverso de receptores de membrana en células eucariotas. También se les conoce como receptores de siete segmentos transmembranales. Son polipéptidos únicos de estructura globular y se encuentran inmersos en la membrana celular. Poseen 7 segmentos TM con tres bucles dentro y tres fuera de la célula. El N-terminal se encuentra en el exterior celular y el C-terminal se encuentra en el citosol (12) (figura 2).

La superfamilia de los receptores acoplados a proteína G se dividen en 7 subfamilias, siendo la más grande y de mayor importancia, la familia de la rodopsina o “Clase A”, que a su vez se divide en 6 grupos (α , β , γ , δ , κ , μ); por ahora solo nos enfocaremos en el grupo α . El grupo α de los RAPG incluyen los receptores adrenérgicos, muscarínicos, dopaminérgicos, histaminérgicos y serotoninérgicos (13).

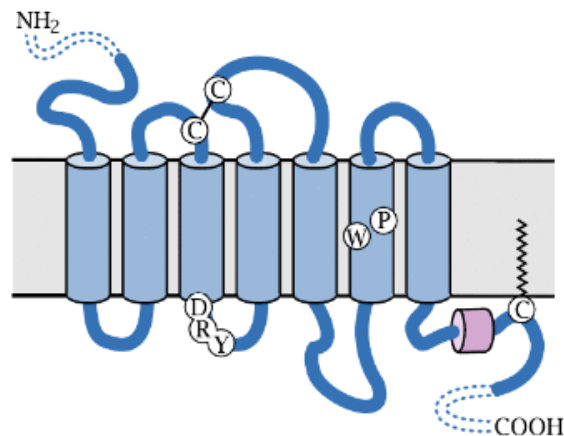


Figura 2: Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Los cilindros representan los 7 dominios transmembranales. El extremo N-terminal, junto con tres bucles, se encuentran en el exterior celular, mientras que el extremo C-terminal y otros tres bucles, se encuentran en el citosol. Tomada del siguiente enlace: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/GPCRs.html>, el 19 de septiembre de 2019 (14).

5.3. Proteína G

Las proteínas G (Proteína fijadora de nucleótido de Guanina) son una familia de proteínas transductoras de señales desde el receptor al que están acopladas hasta una o más proteínas efectoras, y su activación depende del nucleótido guanosin trifosfato (GTP) (15).

Debido a su estructura molecular, las proteínas G se clasifican en dos tipos: heterotriméricas y monoméricas. Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por 3 subunidades, la

alfa (α), la beta (β) y la gama (γ). Cuando se disocia la proteína G heterotrimérica, se forma un dímero estable ($G\beta\gamma$) (16).

La subunidad $G\alpha$ tiene sitios de unión para el guanosín difosfato (GDP) y el dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor acoplado a proteína G se activa, se promueve el intercambio de GDP por GTP, y ocurre la separación de la subunidad $G\alpha$ -GTP tanto del receptor como del dímero $G\beta\gamma$. Estas subunidades libres modulan la actividad de efectores como las enzimas y los canales iónicos. La señalización termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ que convierte el GTP en GDP. El trímero se asocia de nuevo y regresa a su estado basal (17).

La proteína G que interactúa con la familia de canales Kir3 o GIRK es $G\alpha i/G\alpha o$ la cual inhibe a la enzima adenilato ciclasa (figura 3).

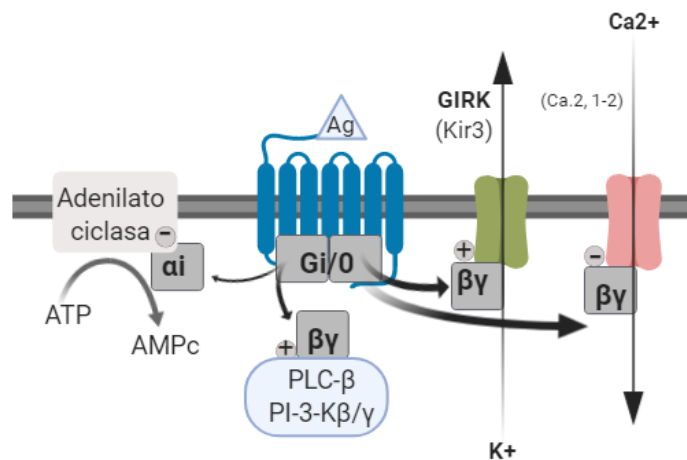


Figura 3. Vía de señalización de las proteínas $G\alpha i/G\alpha o$. Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005 (17).

La vía comienza cuando un agonista (Ag) se une a la cara extracelular del receptor, causando cambios conformacionales en toda la estructura del receptor. Una vez estando activado, el RAPG se acopla a la proteína G y ocurre un intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, lo que produce la disociación del trímero $G\alpha\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ se separa del dímero $G\beta\gamma$ y se asocia a la enzima adenilato ciclasa, inhibiéndola.

5.4. Subfamilia Kir3 (GIRK)

Los canales Kir3 se activan por una variedad de receptores inhibitorios; su apertura está regulada por proteínas G heterotriméricas del tipo Gi/GO (18).

Los canales Kir3 son particularmente activados por el dímero G $\beta\gamma$, y es por eso por lo que se les denomina canales GIRK (canales de potasio rectificadores entrantes activados por proteínas G) (19, 20).

Los neurotransmisores como la acetilcolina, dopamina, opioides, serotonina, somatostatina o adenosina también activan a los canales GIRK al interactuar con su receptor metabotrópico Gi (18).

Se han reportado 5 miembros de esta subfamilia. Los canales GIRK1 y GIRK4 se clonaron del nodo sinoauricular de ratón y rata, respectivamente, los canales GIRK2 y GIRK3 se clonaron de cerebro de ratón y el canal GIRK5 se clonó de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (XI) (21, 22, 23, 24).

Los canales GIRK en las células excitables como las neuronas y el corazón, participan en las sinapsis de tipo inhibitorias. En contraste, no se conoce el papel fisiológico de los canales GIRK en las células no excitables, donde se ha identificado su expresión; como es el caso del canal GIRK5 en los ovocitos de *Xl*, el canal GIRK4 en adenomas de glándulas adrenales (25), los canales GIRK1/GIRK2 y GIRK4 en líneas celulares de cáncer de mama (26), entre otros.

5.4.1. Canal GIRK5 (Kir 3.5)

El canal GIRK5 se expresa en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (27). En los ovocitos la corriente basal es dependiente de una poza endógena de proteínas G $\beta\gamma$ libres que mantienen activo al canal GIRK5 (28).

El canal GIRK5 posee una tirosina (Y16) dentro de un sitio de fosforilación en su extremo amino terminal (29). El canal fosforilado (Y16-Pi), por acción de una tirosina cinasa endógena, se mantiene retenido en el retículo endoplásmico (30) y evita el tráfico del canal GIRK5 hacia la superficie y, como consecuencia, su expresión funcional (31). Al desfosforilarse la Y16-Pi por fosfatasas endógenas, GIRK5 se dirige a la membrana plasmática, hacia el polo vegetal del ovocito, debido a la presencia de un motivo de dileucina en su N-terminal (30).

5.5. *Xenopus laevis* (Xl)

La rana sudafricana *Xenopus laevis* se ha utilizado como modelo de desarrollo. Los ovocitos de *Xl* han sido ampliamente utilizados en la investigación como un sistema de expresión heteróloga de proteínas, como canales iónicos y transportadores, además de constituir el modelo mejor caracterizado de la maduración y fertilización (32).

Los ovocitos de *Xl* proporcionan varias ventajas por su capacidad para traducir eficazmente el ARN heterólogo, lo cual ha permitido registrar las propiedades eléctricas de una infinidad de canales iónicos (figura 2A).

Xenopus laevis se cría y se mantiene en cautiverio a un costo relativamente bajo. Debido a su gran diámetro (~1,1 mm), los ovocitos son particularmente susceptibles a manipulaciones como la inyección de ARNc y los experimentos electrofisiológicos (33).

Los ovocitos de *Xl* son células asimétricas con una polaridad interna compleja. Por un lado, el polo animal de color oscuro contiene al núcleo, el retículo endoplásmico (RE) y los

gránulos pigmentados (melanosomas) (34). Por otro lado, el plasma germinal, que es la fuente de ADN en una célula germinal, y una nube mitocondrial se distribuyen uniformemente en el citoplasma hacia el polo vegetal de color verde pálido (figura 2B) (35, 36).

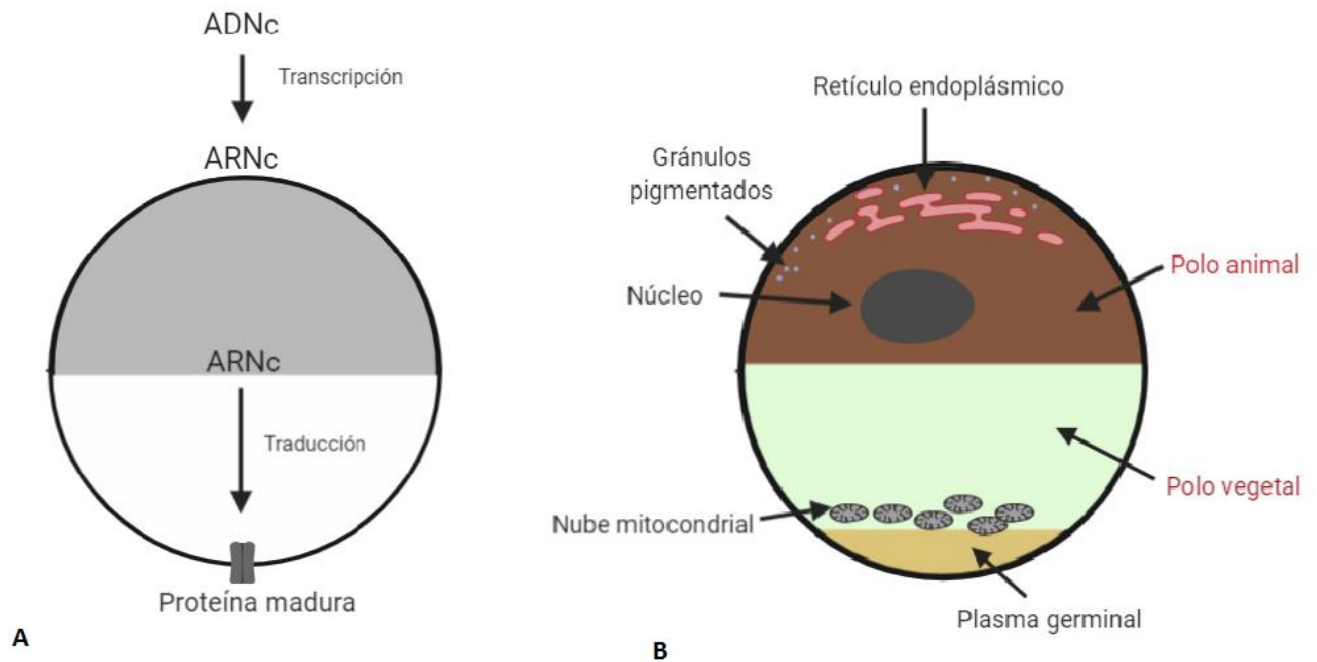


Figura 4: Ovocito de *Xenopus laevis*. En A se representan los procesos de transcripción in vitro y traducción, dando lugar a una proteína de membrana madura. B esquema que muestra tanto al polo vegetal como animal del ovocito, así como los organelos que lo constituyen.

5.6. Proteómica

El término “proteoma” fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de proteínas de un genoma, en una célula o un tejido. Tiempo después la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la “Proteómica” (37). La proteómica es el análisis del complemento proteico completo de una célula, tejido u organismo bajo condiciones

específicas (38), y representa una herramienta que permite establecer la conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico (37). El proteoma se caracteriza por ser dinámico y es reflejo del ambiente en el que está siendo estudiado, de manera que, como respuesta a diversos estímulos, tanto externos como internos, las proteínas pueden ser modificadas postraduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas (39).

La proteómica surgió en los años ochenta gracias a la construcción de bases de datos de proteínas utilizando electroforesis bidimensional (2D-PAGE), sin embargo, fue hasta los años noventa cuando surgió la espectrometría de masas, como un método analítico muy poderoso que permite la rápida identificación de las proteínas. El desarrollo de la espectrometría de masas, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marcó el comienzo de la era de la proteómica (37).

Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones proteína-proteína, de modificaciones postraduccionales, el análisis funcional de las proteínas y estudios de localización.

5.6.1. Tipos de proteómica

Existen dos tipos de proteómica: proteómica dirigida (targeted proteomics) y proteómica no dirigida (untargeted proteomics).

La proteómica dirigida se refiere a la detección, cuantificación y/o caracterización de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas (37).

La proteómica no dirigida es el estudio cuantitativo y cualitativo de las proteínas presentes en una muestra sin apuntar a una proteína específica. La proteómica no dirigida se divide

en tres tipos: proteómica de expresión, proteómica estructural y proteómica funcional (38, 39).

5.6.1.1. Tipos de proteómica no dirigida

La proteómica de expresión es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad y proteínas de interés en la microbiología médica (38, 39).

La proteómica del mapa celular o estructural se dirige a mapear la estructura, localización y naturaleza de los complejos de proteínas presentes en un organelo celular particular, mediante la purificación de organelos o complejos, y la posterior identificación de sus componentes mediante la espectrometría de masas. El objetivo es identificar todas las proteínas presentes en un complejo y caracterizar todas las interacciones proteína-proteína que ocurren entre estas proteínas (39).

La proteómica funcional permite el estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado, proporcionando información importante sobre señalización, mecanismos de una enfermedad o interacciones proteína-fármaco (39).

Dentro de una célula la función de las proteínas está relacionada con las interacciones proteína-proteína en las que participa. Comprender su función biológica y las vías de señalización celular depende de la identificación de dichas interacciones (40).

5.7. Bioinformática

La bioinformática se refiere a la aplicación de la informática en el campo de la biología. La bioinformática proteómica se encarga de desarrollar bases de datos y algoritmos computacionales para el almacenamiento, difusión y análisis, posterior a la obtención de los datos generados en un análisis proteómico (41).

La proteómica depende de la bioinformática para procesar los datos espectrales de masas e identificar las proteínas involucradas (38).

Para el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se utilizaron los siguientes softwares y bases de datos:

UniProt es una base de datos de libre acceso de secuencias proteicas e información funcional, que se derivan de la secuenciación del genoma. Contiene una gran cantidad de información sobre la función biológica de las proteínas.

STRING es una base de datos de interacciones proteína-proteína conocidas y previstas. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) y provienen de cinco fuentes principales: predicciones de contexto proteómico, experimentos de laboratorio de alto rendimiento, coexpresión, extracción de texto automatizada y conocimientos previos en bases de datos.

La base de datos STRING actualmente cubre 9,643,763 proteínas de 2,031 organismos.

PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships) es un sistema diseñado para clasificar las proteínas (y sus genes) con el fin de facilitar el análisis de alto rendimiento. Las proteínas se han clasificado según familias y subfamilias, función molecular, proceso biológico y ruta. La versión 14.1 contiene 15,524 familias de proteínas, divididas en 107,627 subfamilias de proteínas funcionalmente distintas.

Xenbase es una base de datos de organismos modelo que proporciona recursos informáticos, así como datos genómicos y biológicos sobre las ranas *Xenopus*. Cubre las variedades *X. laevis* y *X. tropicalis*.

5.8. Interactoma

Un interactoma es una representación compleja de todas las interacciones funcionales entre moléculas dentro de una célula o dentro de un organismo completo (42). Los interactomas basados en interacciones proteína-proteína (PPI) proporcionan una visión global de todas las posibles interacciones moleculares que puede presentar una proteína (43). Un interactoma representa las interacciones proteína-proteína y nos brinda una idea de su funcionalidad y sus posibles mecanismos.

6. Objetivos

6.1. General

Identificar las proteínas que interactúan con el canal GIRK5 y la mutante GIRK5Y16A en el ovocito de la rana *Xenopus laevis*.

6.2. Particulares

- I. Sobreexpresar los canales GIRK5 y GIRK5Y16A en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.
- II. Obtener el inmunoprecipitado de los canales GIRK5 y GIRK5Y16A
- III. Procesar las muestras de inmunoprecipitado para su posterior análisis.
- IV. Obtener el interactoma de los canales GIRK5 y GIRK5Y16A.
- V. Analizar los resultados obtenidos con el uso de programas bioinformáticos.
- VII. Comparar los interactomas.

7. Hipótesis

El análisis de los interactomas permitirá identificar proteínas que participan en procesos de tráfico y proliferación celular, que interactúan con los canales GIRK5 (retículo endoplásmico) y GIRK5Y16A (membrana plasmática).

8. Procedimiento experimental.

En el laboratorio se cuenta con el plásmido PBF (de expresión en ovocito) que contiene la secuencia codificante del canal GIRK5, así como la secuencia correspondiente a la proteína verde fluorescente (EGFP-C1) (figura 5). También al canal mutado GIRK5Y16A, en la que se cambió la tirosina de la posición 16 por el aminoácido alanina.

8.1. Transcripción *in vitro*

El mRNA complementario (cRNA) de los canales se sintetizó utilizando el kit mMessage mMachine (Ambion Corporation, Austin, TX.) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El ARNc de ambos canales (GIRK5- EGFP y GIRK5Y16A-EGFP) se sintetizó con la enzima SP6 RNA polimerasa. Los mRNAs obtenidos fueron analizados mediante su electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración de los ácidos nucleicos en solución se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

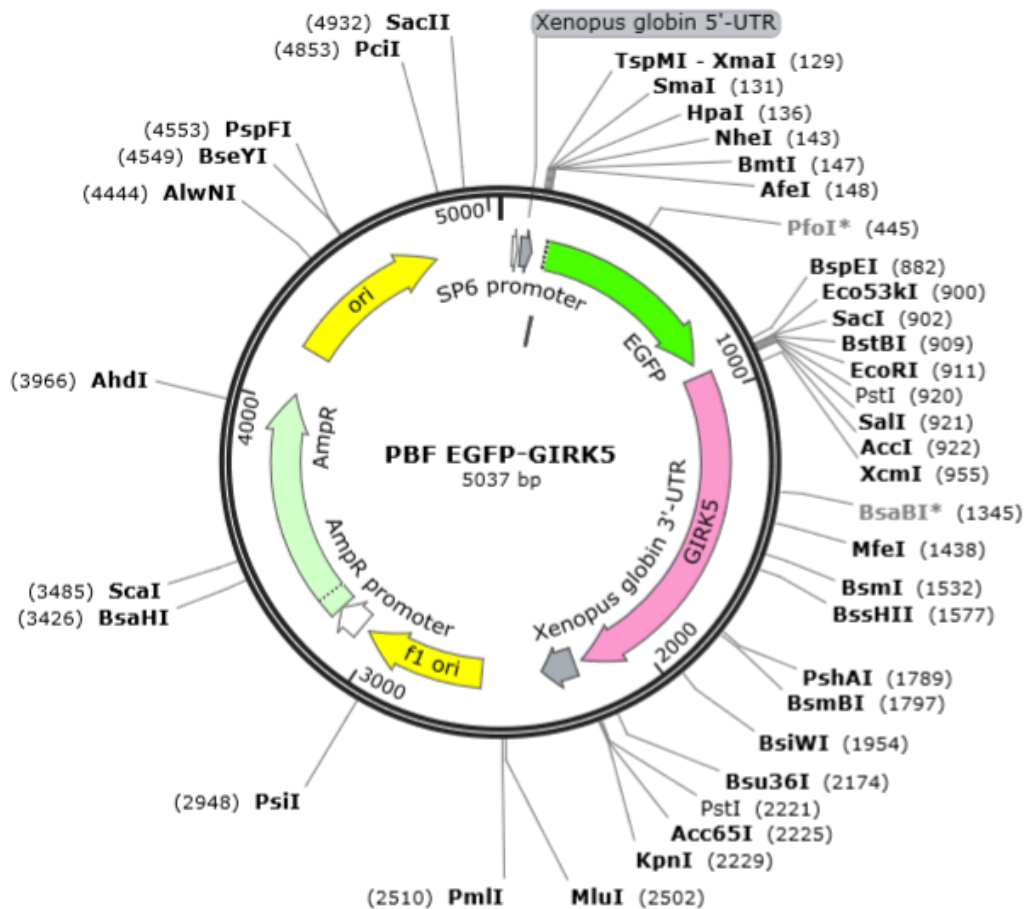


Figura 5: Mapa del vector PBF EGFP-GIRK5. De color verde se presenta la secuencia que pertenece a la proteína EGFP-C1 y en rosa, la secuencia del canal GIRK5, además se muestran los sitios de unión de algunas enzimas de restricción.

8.2. Obtención y manejo de los ovocitos

Se anestesió una rana hembra de la especie *Xenopus laevis* por inmersión en triclaína 0.2%. Los ovocitos en los estadios V-VI se obtuvieron por ovariectomía parcial, la cual consiste en realizar una pequeña incisión en la piel y el músculo en la zona del vientre de la rana de aproximadamente 1 cm arriba del pliegue del anca. Los ovocitos se mantienen en solución ND96 (ver anexo) sin calcio y se desfolicularon mediante una digestión enzimática con colagenasa (2mg/mL), durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 5 lavados de los ovocitos con medio ND96 sin calcio para

remover la colagenasa, 5 lavados con medio ND96 con calcio y por último 5 lavados con ND96 con calcio más gentamicina (0.05 mg/mL). Los ovocitos se mantienen en un incubador a 18°C hasta su uso.

8.3. Microinyección del RNA en los ovocitos

Transcurridas 24 horas de la obtención de los ovocitos, se seleccionaron aquellos que se encontraban en el estadio V-VI (mayor tamaño, polos definidos y forma redonda). Se inyectaron 25 ng de mRNA de los canales GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, suspendidos en solución amortiguadora Tris-EDTA (Tris HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7), a cada ovocito. La inyección de 50 nL por ovocito se efectúa mediante un manipulador y un microinyector manual. Los ovocitos inyectados se mantuvieron a 18°C en medio ND96 con calcio más gentamicina (1.250 mL/ L) durante 3 días para permitir la traducción del RNA inyectado.

8.4. Homogenado celular

Se homogenaron 50 ovocitos de cada grupo (grupo 1: ovocitos inyectados con GIRK5-EGFP, grupo 2: ovocitos inyectados con GIRK5Y16A-EGFP) usando 2 µL de buffer de extracción de proteínas (ver anexo) por ovocito y pasándolos 20 veces por una aguja de 30G. Los homogenados se centrifugaron por duplicado a 200 rcf (Relative Centrifugal Force) durante 5 min a 4°C removiendo la fracción correspondiente a la yema del ovocito. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 14,000 rcf durante 20 min a 4°C. El sobrenadante final se colocó en un tubo de 600 µL, se ajustó su volumen a 0.5 mL con buffer de extracción de proteínas y se almacenó a -20°C.

8.5. Cuantificación de proteínas (Método Lowry)

Se realizó una curva de calibración de proteínas con albúmina en SSI (solución salina isotónica) en un rango de concentraciones de 0.06 a 2 mg/mL y se realizaron 2 diluciones de las muestras (1:10 y 1:20). Se utilizó el kit BioRad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del proveedor y posteriormente se leyeron las absorbancias de todas las muestras a 750 nm, usando un espectrómetro UV.

8.6. Inmunoprecipitación

8.6.1. Preparación de perlas

Se lavaron por triplicado 50 μ L de perlas de Protein G Sepharose[®], por cada muestra, con 50 μ L de buffer de extracción de proteínas, se centrifugaron a 12,000 rcf por 20 s a 4°C entre cada lavado y finalmente se resuspendió el pellet en 100 μ L del mismo buffer.

8.6.2. Preaclarado de las muestras

Para eliminar de las muestras cualquier proteína que se una de forma no específica a las perlas de sefarosa, se incubaron 2 mg de lisado celular de cada muestra, con 20 μ L de la suspensión de perlas de sefarosa y se mezclaron durante 2 h a 4°C. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugaron los preaclarados a 12,000 rcf por 20 s; se recuperaron y se almacenaron los sobrenadantes a -20°C.

8.6.3. Formación del complejo inmune

A los tubos de preaclarado se les agregaron 5 μ g de anticuerpo 3E6 (anti-GFP, mAb 3E6, Invitrogen) y se incubaron con agitación lenta y constante durante toda la noche a 4°C.

8.6.4. Inmunoprecipitación

Se agregaron 50 μ L de la suspensión de perlas a cada tubo de complejo inmune, y se incubaron con agitación lenta y constante durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugaron los tubos de la inmunoprecipitación a 12,000 rcf durante 1 min a 4°C. El inmunoprecipitado (Ip) obtenido fue lavado por triplicado con buffer de extracción de proteínas, y por duplicado con buffer de lavado (ver anexo), usando 1 mL de cada buffer y centrifugando a 12,000 rcf, durante 1 min a 4°C entre cada lavado. El Ip se resuspendió en 40 μ L de buffer de extracción y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

8.7. Electroforesis y Western Blot (Inmunodetección indirecta)

Las muestras se mezclaron con volúmenes iguales de buffer de carga (Laemmli, Bio-Rad) con 5% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad) y se incubaron a 95°C durante 5 min para separar el inmunoprecipitado de las perlas de sefarosa y desnaturalizar las proteínas. Se cargaron los inmunoprecipitados obtenidos y 5 μ L de marcador de peso molecular en un gel de poliacrilamida al 8% y se realizó la electroforesis usando buffer SDS-Tris-glicina (ver anexo) a 120 V (gel concentrador) y 150 V (gel separador).

Al finalizar la electroforesis se realizó la transferencia semiseca de las proteínas a una membrana de PVDF (Immuno Blot PVDF membrane for protein blotting), a 10 V durante una hora. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween 0.1% (TBS-T, ver anexo), y se bloqueó con solución de bloqueo (ver anexo), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró la solución de bloqueo y se incubó la membrana con anticuerpo primario GF28R (GFP monoclonal antibody, Invitrogen), durante 18 horas a 4°C con agitación lenta. Una vez terminado el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y se incubó con anticuerpo secundario (donkey anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz) durante una hora con leve agitación a temperatura ambiente. Finalmente, para la detección de las proteínas se utilizó el kit de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad) y se reveló por autorradiografía en placas para rayos X.

8.8. Tinción con azul de coomassie

Para detectar las proteínas en el gel se realizó una tinción con azul de coomassie; se lavó el gel con agua bidestilada tres veces durante 10 min cada lavado, se retiró el agua y se le agregaron 50 mL de azul de coomassie (Bio-safe Coomassie G-250, Bio-Rad), se incubó durante una hora con agitación leve y posteriormente se lavó el gel con agua bidestilada por triplicado.

8.9. Preparación de la muestra para su análisis proteómico

Todos los procedimientos realizados para la preparación de la muestra final que fue enviada para su análisis proteómico fueron realizados en una campana de flujo laminar vertical, para evitar que la muestra se contaminara.

Se inyectaron 90 ovocitos con el ARN correspondiente del canal GIRK5-EGFP y el canal GIRK5Y16A-EGFP, después de 3 días de expresión fueron lisados con buffer de extracción de proteínas y se cuantificó la concentración de proteína.

Para la formación de los inmunoprecipitados se utilizaron 2 mg de proteína de cada muestra y el experimento se llevó a cabo como se menciona en la fracción 8.6. “inmunoprecipitación”.

La electroforesis se realizó a 150 V durante 10 minutos en una cámara XCell SureLock Mini-Cell's, utilizando NuPAGE 10% Bis-Tris Gel de 1 mm de espesor. El buffer de electroforesis que se utilizó fue MOPS SDS Running Buffer 1X.

Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con 50 mL de azul de Coomassie (Bio-safe Coomassie G-250, Bio-Rad). Se dejó en agitación moderada durante 1 h y al terminar la tinción, se lavó el gel 10 veces con agua bidestilada.

8.10. Proteómica

Se realizó un segundo proceso de electroforesis en gel de acrilamida que se detuvo cuando el frente de corrida avanzó aproximadamente 1 cm. Se cortó la banda teñida del gel, correspondiente a la muestra de inmunoprecipitado de los canales GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, y se destiñeron con solución de desteñido (50% metanol y 2.5% ácido fórmico en agua grado HPLC), después se deshidrataron con ACN. Posteriormente se trataron las proteínas presentes en la muestra con DTT 100 mM (proceso de reducción) y con IAA 50 mM (proceso de alquilación), para mantener las estructuras proteicas lineales.

Se realizaron una serie de lavados con ABC 100 mM y después se deshidrataron los geles con ACN, evaporando el ACN restante en un concentrador Speedvac. Para digerir las proteínas se incubaron las muestras con 20 ng/ μ L de tripsina y ABC 50 mM a 37°C durante toda la noche, dando lugar a la formación de péptidos con lisina o arginina en el extremo carboxilo. Después de la digestión enzimática se agregó una solución de ácido fórmico al 5% en agua HPLC para inactivar a la tripsina y una solución de ácido fórmico 5% y acetonitrilo 50% en agua HPLC para extraer los péptidos del gel. Se separaron los restos de gel y el sobrenadante se concentró hasta 20 μ L. Finalmente se desalaron las muestras en una columna C-18 (Pierce C-18 spin column, Thermo Scientific) y se eluyeron los péptidos con 50:50 agua: metanol y ACN 5%. Las muestras recolectadas se concentraron hasta 20 μ L.

Se inyectaron 4.5 μ L de las muestras en una precolumna Symmetry C18 Trap V/M (Waters, Milford, MA), utilizando como fase móvil A 0.1 % de ácido fórmico en agua y fase móvil B 0.1% de ácido fórmico en ACN. Los péptidos se separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA). Los datos del espectro se obtuvieron de un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y separación de movilidad iónica Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA). La preparación de las muestras para el análisis proteómico descrito se realizó en el LaNSE del CINVESTAV Zacatenco.

9. Resultados y discusión

9.1. Transcripción *in vitro*

Una vez terminada la reacción de transcripción *in vitro*, se tomó 1 μ L del ARN obtenido para cada canal y las muestras se trataron con buffer de corrida y GelRed, y se corrieron en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE. El gel se expuso en un transiluminador y se observaron las siguientes bandas:

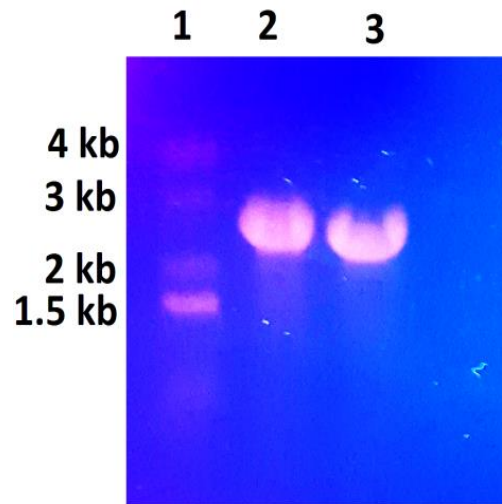


Figura 6: ARN obtenido de la transcripción *in vitro*. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular. El carril 2 y 3 corresponden al ARN del canal GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, respectivamente, con un peso aproximado de 2.3 kb.

En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 2.3 kb que corresponde al ARN del canal GIRK5-EGFP, mientras que en el carril 3 se observa una banda del mismo peso que corresponde al canal GIRK5Y16A-EGFP. Una vez obtenidas las muestras de ARN, se procedió con su cuantificación y posterior microinyección a los ovocitos de *X. laevis*.

9.2. Inmunoprecipitación

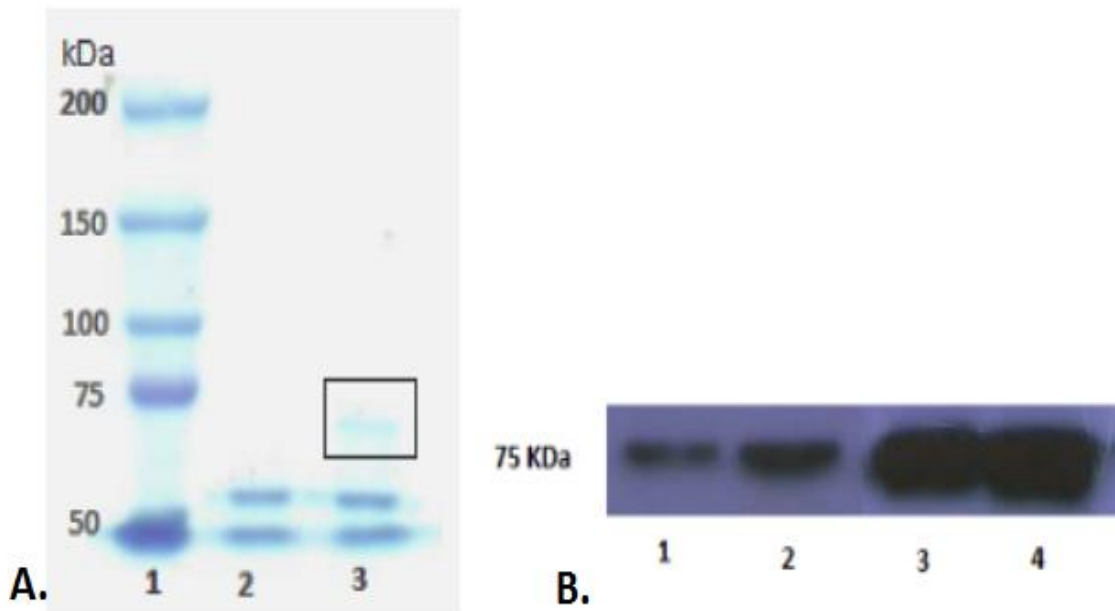


Figura 7. Resultados de la inmunoprecipitación. A: Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie; en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, mientras que en los carriles 2 y 3 se presentan los inmunoprecipitados de los canales GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, respectivamente. Solo se aprecia la banda correspondiente al canal GIRK5Y16A-EGFP, con un peso aproximado de 75 kDa. B: Los carriles 1 y 2 corresponden al inmunoprecipitado del canal GIRK5-EGFP, mientras que los carriles 3 y 4 corresponden al canal GIRK5Y16A-EGFP, para ambos canales, las bandas se observan con un peso de aproximadamente 75 kDa.

En la figura 7A se logra apreciar sólo la banda correspondiente al inmunoprecipitado del canal GIRK5Y16A-EGFP. Cabe destacar que antes de la electroforesis, las muestras se calientan a 95°C durante 5 min para separar de las perlas de agarosa, las proteínas contenidas en el inmunoprecipitado, además de que se disocian todas las proteínas, por lo que el peso de las bandas obtenidas en la figura 7B corresponden a los canales GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP.

9.3. Análisis proteómico

Se identificaron 96 proteínas en el inmunoprecipitado con el canal GIRK5-EGFP y 379 proteínas con el canal GIRK5Y16A-EGFP. Para analizar los datos crudos obtenidos se aplicaron los filtros siguientes:

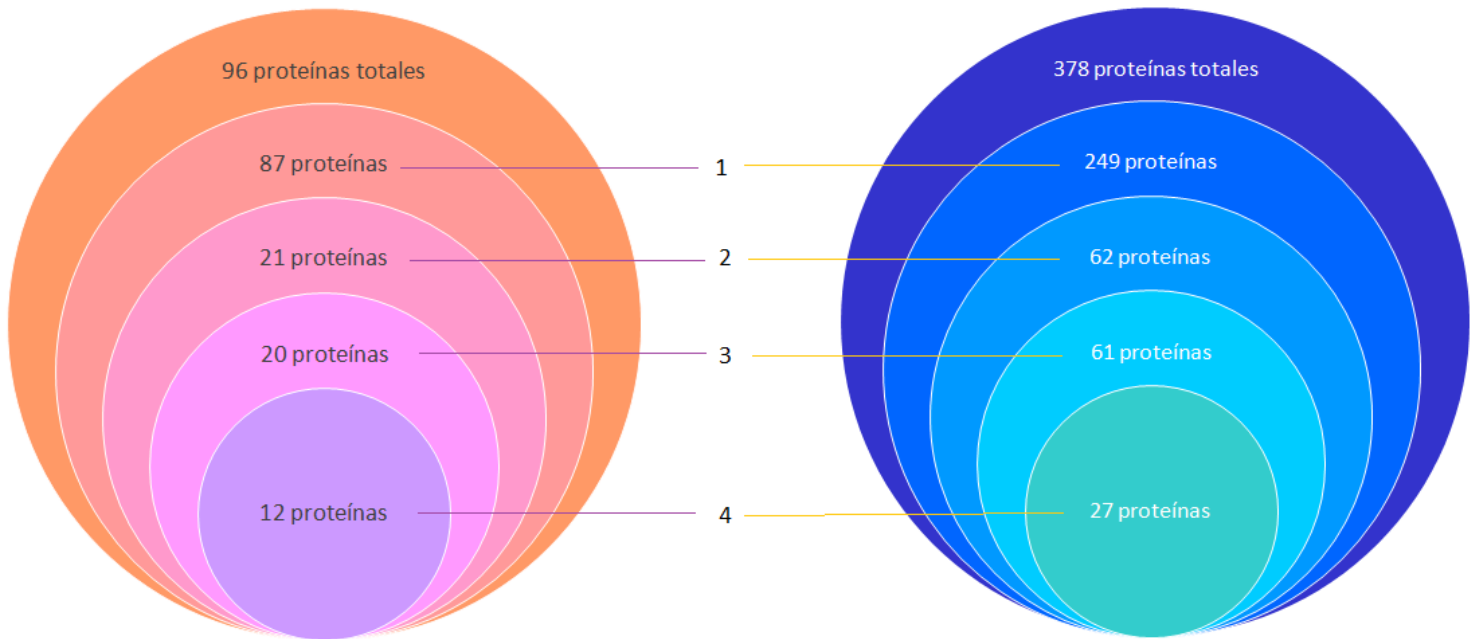


Figura 8. Diagrama de Venn de las proteínas obtenidas después de la aplicación de los filtros a los resultados del análisis proteómico. En los círculos se representa el número de proteínas que fueron quedando cada que se aplicaba un filtro a los datos obtenidos en los ensayos proteómicos. Después del filtro 1 quedaron las proteínas que fueron identificadas con el 95% de confianza; en el filtro 2 se eliminaron las proteínas cuya intensidad de pico era igual a 0; el filtro 3 fue eliminar las proteínas que no fueron leídas de N-terminal a C-terminal y, por último, en el filtro 4 se eliminaron las proteínas que no estaban caracterizadas.

Como resultado de la aplicación de los filtros, quedaron 12 proteínas en el ip del canal GIRK5-EGFP y 27 proteínas del canal GIRK5Y16A-EGFP. Posteriormente se analizaron estos

resultados en STRING con el fin de conocer las interacciones proteína-proteína, descritas hasta el momento, que hay entre las proteínas encontradas en cada muestra. Se obtuvieron los interactomas correspondientes al inmunoprecipitado del canal GIRK5-EGFP (figura 9) y del canal GIRKY16A-EGFP (figura 14).

En el programa STRING no se encuentra disponible la base de datos de la rana *Xenopus laevis*, el análisis se realizó con la base de datos para *Xenopus tropicalis*.

9.3.1. Canal GIRK5-EGFP

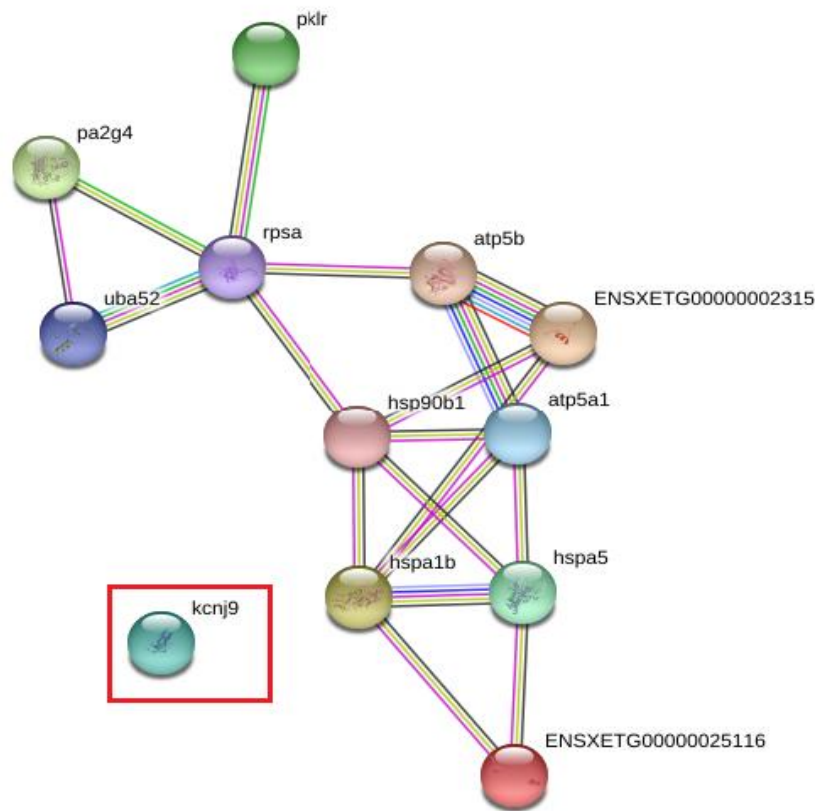


Figura 9: Interactoma del canal GIRK5-EGFP en ovocito de la rana *Xenopus laevis*. Cada esfera representa una de las 12 proteínas identificadas con el respectivo nombre del gen que las codifica; la estructura en el interior de algunas esferas significa que su estructura 3D se ha predicho o es conocida. Las líneas representan las interacciones proteína-proteína; las de color verde indican que ambas proteínas se mencionan en un mismo texto; las azules,

que se encuentran en bases de datos actualizadas y las rosas, que están determinadas con soporte experimental. KCNJ9 (la esfera señalada en el recuadro rojo) es el gen que codifica para el canal GIRK5.

En la figura 9 se representa la red de interacciones (interactoma) proteína-proteína que ocurren entre las 11 proteínas que fueron inmunoprecipitadas junto con el canal GIRK5--EGFP. Hasta el momento no hay ninguna interacción directa reportada del canal GIRK5 de retículo endoplásmico con alguna de las proteínas presentes, sin embargo, eso no implica que no exista alguna. El nombre y descripción de las proteínas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Nombre asignado por STRING, gen ID y descripción de las 12 proteínas identificadas en el análisis proteómico, que inmunoprecipitaron con el canal GIRK5-EGFP. El nombre del gen es el que se representa en el interactoma (Figura 9).

NOMBRE DEL GEN.	GEN ID	DESCRIPCIÓN.
Actb	XB-GENE-866011	Actina citoplásmica 1 (375 aa)
ATP5C1	XB-GENE-970735	ATP sintasa, subunidad alfa (527 aa)
hspa1b	XB-GENE-6493998	HSP70 Proteína de choque térmico, 1B (640 aa)
pa2g4	XB-GENE-943140	Proteína 2G4 asociada a proliferación (395 aa)
Pklr	XB-GENE-5918095	Piruvato cinasa (535 aa)
hspa5	XB-GENE-17331987	Proteína de choque térmico, miembro 5 (655 aa)
kcnj9	XB-GENE-5906252	Canal de potasio rectificador entrante (422 aa)
atp5a1	XB-GENE-944572	ATP sintasa F1, subunidad alfa (467 aa)
uba52	XB-GENE-939931	Ubiquitina A-52 (128 aa)
Rpsa	XB-GENE-17333214	40S Proteína ribosomal SA (306 aa)
hsp90b1	XB-GENE-866383	HSP90 Proteína de choque térmico, beta (803 aa)
atp5b	XB-GENE-17340769	ATP sintasa, beta (537 aa)

Se analizaron las proteínas con el programa PANTHER GO-Slim para poder clasificarlas de acuerdo con las categorías de “Función molecular” (Figura 10), “Proceso biológico” (Figura 11), “Clase de proteína” (Figura 12) y “Vía de señalización” (Figura 13). Dicha información está contenida en los diagramas de pastel de las figuras 10 a la 13.

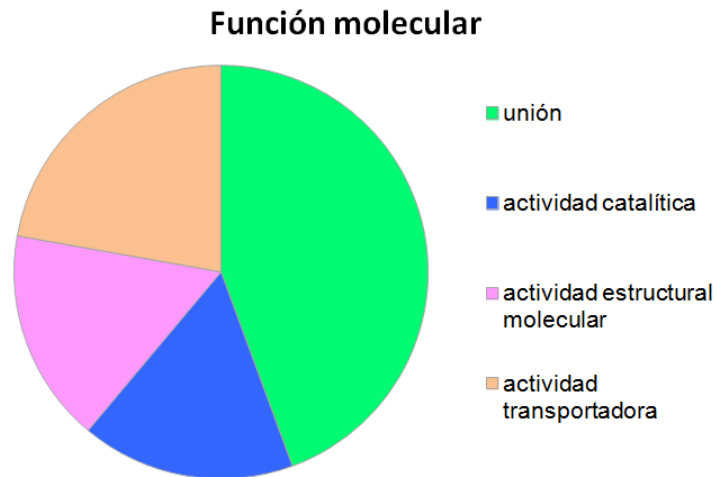


Figura 10. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las funciones moleculares de las 12 proteínas detectadas y son agrupadas en las siguientes categorías: unión, actividad catalítica, actividad estructural molecular y actividad transportadora.

En la figura 10, las proteínas de unión son las proteínas de choque térmico, ATP sintasas, el factor asociado a proliferación (pa2g4) y la ubiquitina; en la categoría de actividad catalítica se encuentran las proteínas de choque térmico y piruvato cinasa; en la de actividad estructural molecular se encuentran la ubiquitina, actina A y proteína ribosomal 40s, mientras que en de actividad transportadora están las proteínas ATP sintasas y el canal GIRK5.

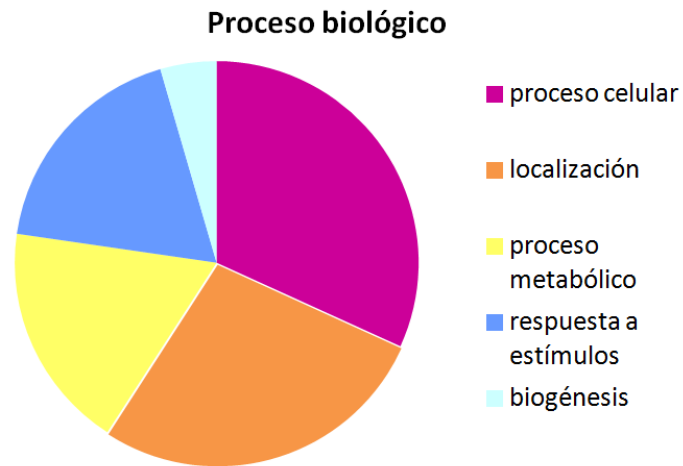


Figura 11. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran los procesos biológicos en los que están involucradas las 12 proteínas detectadas y son agrupadas en las siguientes categorías: proceso celular, localización, proceso metabólico, respuesta a estímulos y biogénesis.

En la figura 11 la categoría proceso celular contiene a las proteínas de choque térmico, subunidad ribosomal 40s, piruvato cinasa, actina y ubiquitina; en proteínas de localización se encuentran las proteínas de choque térmico, el canal GIRK5, la proteína ATP sintasa, actina y la subunidad ribosomal 40s; en la categoría proceso metabólico se encuentran las proteínas ubiquitina, ATP sintasa, piruvato cinasa y la subunidad ribosomal 40s; en respuesta a estímulos están las proteínas de choque térmico y piruvato cinasa, por último, la subunidad ribosomal 40s pertenece a la categoría biogénesis.

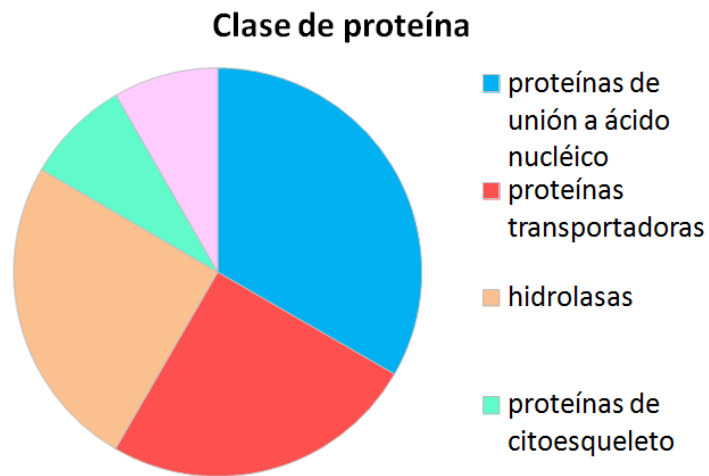


Figura 12. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las clases de proteínas que fueron detectadas: proteínas de unión a ácido nucleico, proteínas transportadoras, hidrolasas, proteínas de citoesqueleto y chaperonas.

En la figura 12, la categoría de proteína de unión a ácido nucleico está formada por proteínas ATP sintasas y ubiquitina; las proteínas ATP sintasas se encuentran también en las categorías de proteínas transportadoras e hidrolasas; la actina es la única proteína de citoesqueleto y en chaperonas se encuentra una proteína de choque térmico.

Vía de señalización

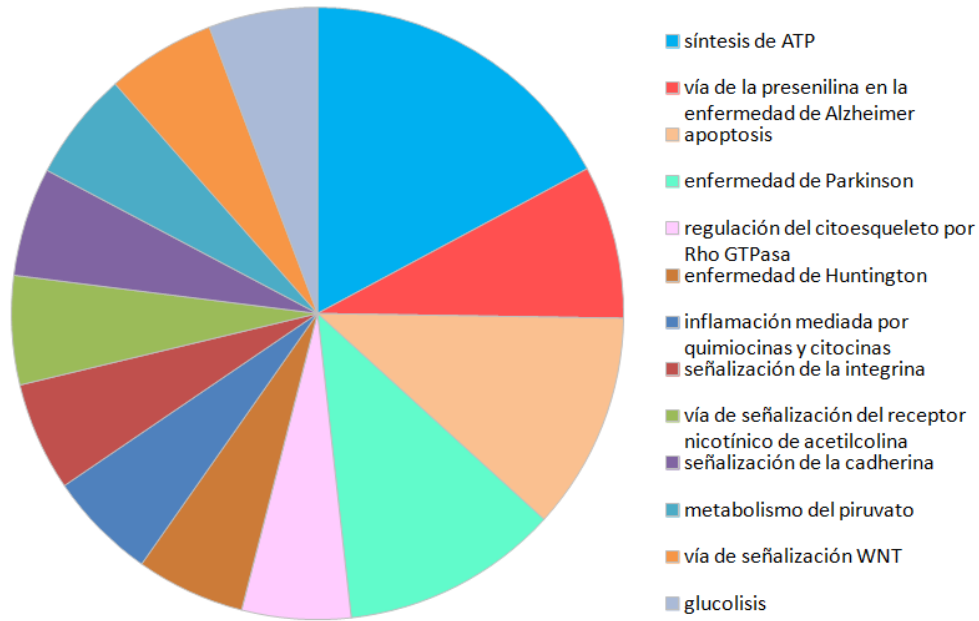


Figura 13. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las vías de señalización en las que están involucradas las proteínas detectadas: síntesis de ATP, vía de la presenilina en la enfermedad de Alzheimer, apoptosis, señalización de la cadherina, regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa, glucólisis, enfermedad de Huntington, inflamación mediada por quimiocinas y citocinas, señalización de la integrina, vía de señalización del receptor nicotínico de acetilcolina, enfermedad de Parkinson, metabolismo de piruvato y vía de señalización WNT.

En la figura 13 las proteínas de síntesis de ATP son las ATP sintasas alfa y beta; las proteínas involucradas en apoptosis son las proteínas de choque térmico; la proteína actina 1 está incluida en las categorías de vía de la presenilina en la enfermedad de Alzheimer, señalización de la cadherina, regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa, enfermedad de Huntington, inflamación mediada por quimiocinas y citocinas, señalización de la integrina, vía de señalización del receptor nicotínico de acetilcolina y vía de señalización WNT, mientras que la piruvato cinasa está presente en las categorías de metabolismo de piruvato y glucólisis, por último las proteínas de choque térmico 1B y 5 están involucradas en la enfermedad de Parkinson.

Se analizaron todas las proteínas obtenidas y, con base en la literatura, se eligieron las proteínas con mayor relevancia para el estudio.

- a) Proteínas de choque térmico: genes HSPA1B (proteína Hsp70), HSPA5 y HSP90B1 (proteína HSP90).

La proteína Hsp70 está involucrada en el plegamiento del canal de potasio hERG (IKr) y su interacción determina la maduración del canal. Se demostró mediante ensayos de inmunoprecipitación que con la previa aplicación de rosuvastatina (bloqueador del canal ERG), disminuyen las interacciones del canal con Hsp70, dando como resultado la reducción de canales maduros (44). Lo mismo ocurre con la interacción del canal hERG y la proteína Hsp90, al aplicar gendalmicina (inhibidor de Hsp90) se bloquea la maduración del canal wt hERG, aumenta su degradación por el proteosoma y reduce las corrientes de hERG en un sistema de expresión heterólogo o en los miocitos de ventrículo. Tanto la Hsp90 como la Hsp70 interactúan directamente con el canal hERG (no glicosilado) en el retículo endoplásmico (RE), pero no con la forma glicosilada del canal en la membrana plasmática (45). Estos datos sugieren que el canal GIRK5 fosforilado en la tirosina Y16, que se encuentra también en el RE, puede interactuar con estas chaperonas, las cuales podrían ser responsables de su correcto plegamiento. Cabe destacar que la Hsp70 prolonga la vida media del canal Kv1.5 en el RE, el aparato de Golgi y la membrana plasmática, y con ello la corriente de potasio por Kv1.5 (46).

De acuerdo con nuestro análisis, a las proteínas Hsp70 y Hsp90 se les asigna la función de actividad catalítica, están involucradas en la localización de otras proteínas y respuesta a estímulos, además, son chaperonas, cuya función es ayudar en el plegamiento de otras proteínas recién sintetizadas.

b) Proteína pa2g4 o EBP1

La proteína pa2g4 (Proliferation- associated protein 2G4) es una proteína que se asocia a procesos proliferativos debido a su interacción con el dominio citoplasmático del receptor ErbB-3. El receptor ErbB-3 es el tercer miembro de la familia ERBB de receptores tirosina quinasa (RTKs), a la cual también pertenece el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB-1) (47). ErbB-3 regula la vía de señalización de MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y la vía ERK ½ (48). Ambas vías son de gran relevancia para el proceso de maduración de los ovocitos. Si el canal GIRK5 interactúa directamente con la proteína pa2g4, podría ser parte de la vía del receptor ErbB-3.

La proteína EBP1 se clasificó únicamente como proteína de unión debido a que es una proteína de unión a DNA de doble cadena, por lo que puede estar involucrada en la traducción de otras proteínas (49).

c) Otras proteínas

Dentro de las proteínas que se identificaron con el canal que se retiene en el retículo endoplásmico y que generan interés, están: Ubiquitina A-52, ATP sintasa, subunidad alfa y el péptido gamma de la ATP sintasa de *Xenopus tropicalis* (atp5c1). Estudios recientes en ovocitos de cerdo han demostrado que la ubiquitina A-52 (UbA52) es esencial en la embriogénesis temprana (50). Por otra parte, en el oído medio, UbA52 regula la secreción de potasio en el epitelio coclear (51). La presencia de la subunidad alfa de la ATP sintasa y el péptido gamma de la ATP sintasa de *Xenopus tropicalis* (atp5c1) sugieren que GIRK5 puede localizarse también en las mitocondrias.

9.3.2. Canal GIRK5Y16A-EGFP

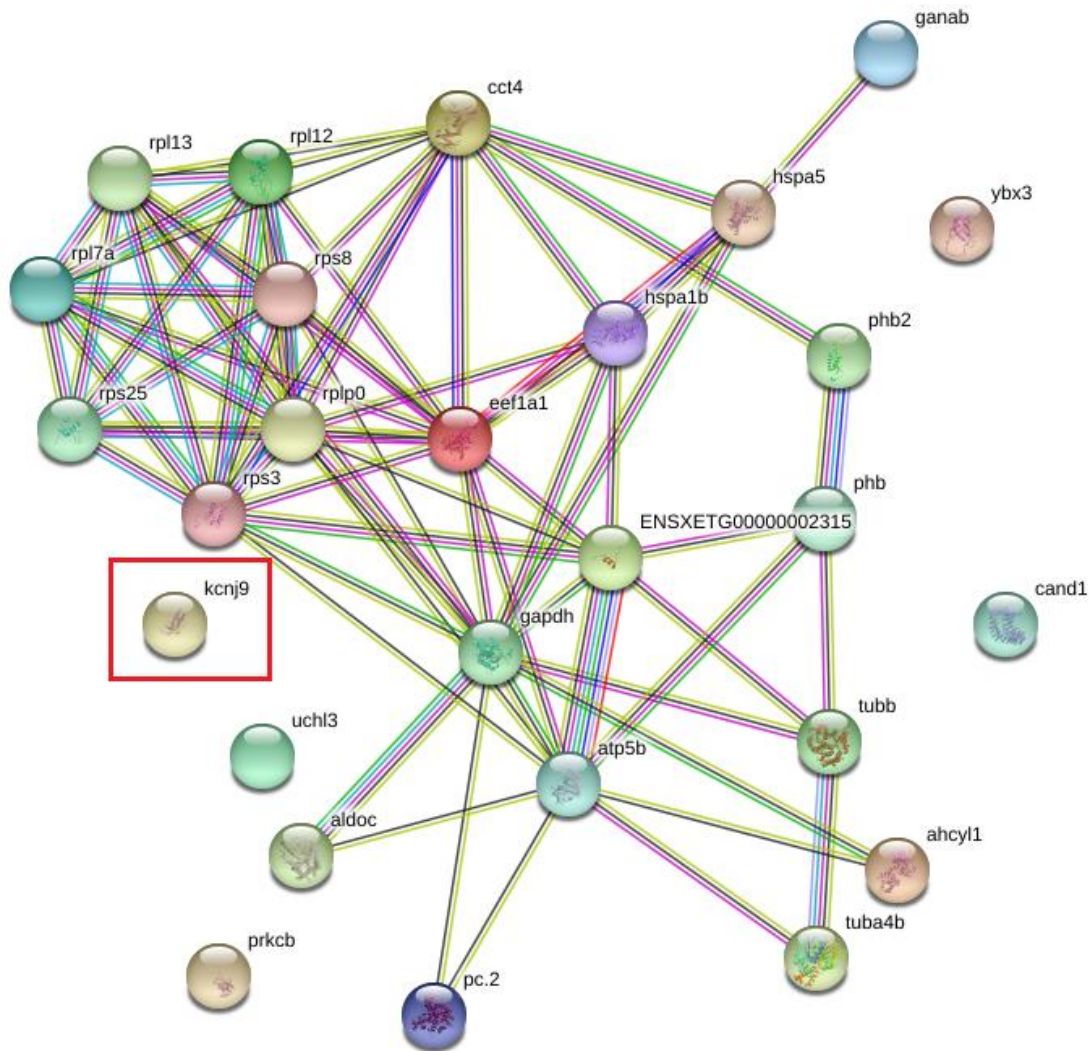


Figura 14: Interactoma del canal GIRK5Y16A-EGFP en ovocito de la rana *Xenopus laevis*. Cada esfera representa una de las 27 proteínas identificadas, la estructura en el interior de algunas significa que su estructura 3D se ha predicho o es conocida. Las líneas representan las interacciones proteína-proteína; las de color verde, indican que ambas proteínas se mencionan en un mismo texto; las azules, que se encuentran en bases de datos actualizadas; las rosas, que están determinadas con soporte experimental y las de color gris, indican que se trata de proteínas homólogas. KCNJ9 (la esfera señalada en el recuadro rojo) es el gen que codifica para el canal GIRK5.

En la figura 14 se representa la red de interacciones (interactoma) proteína-proteína que ocurren entre las 27 proteínas que fueron inmunoprecipitadas junto con el canal de membrana plasmática (GIRK5Y16A-EGFP). Hasta el momento no hay ninguna interacción directa reportada del canal GIRK5 de membrana plasmática con alguna de las proteínas presentes, sin embargo, eso no implica que no exista alguna. El nombre y descripción de las proteínas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Nombre asignado por STRING, gen ID y descripción de las 27 proteínas identificadas en el análisis proteómico, que fueron inmunoprecipitadas con el canal GIRK5Y16A-EGFP. El nombre del gen es el que se presenta en el interactoma (figura 14).

NOMBRE DEL GEN	GEN ID	DESCRIPCIÓN
eef1a1	XB-GENE-17330683	Factor de elongación de traducción eucariota alfa 1 (462 aa)
ahcy1	XB-GENE-17337990	Adenosylhomocysteinasa-I tipo 1 (523 aa)
cct4	XB-GENE-974489	Chaperonina que contiene TCP1, subunidad 4 (542 aa)
atp5f1a	XB-GENE-944572	ATP sintasa subunidad alfa (527 aa)
rpl12	XB-GENE-17344949	Proteína ribosomal L12 (195 aa)
uchl3	XB-GENE-980865	ubiquitina C-terminal hidrolasa L3 (230 aa)
rpl7a	XB-GENE-17331209	Proteína ribosomal L7a (266 aa)
ganab	XB-GENE-997259	Alfa glucosidasa (940 aa)
pc.2	XB-GENE-17340399	Piruvato carboxilasa (1178 aa)
hspa1b	XB-GENE-6493998	Proteína de choque térmico, 1B (640 aa)
rps3	XB-GENE-978304	Proteína ribosomal S3 (247 aa)
rps8	XB-GENE-17335054	Proteína ribosoma S8 (207 aa)
ybx3	XB-GENE-17343680	Proteína de unión a la caja Y, 3 (307 aa)
hspa5	XB-GENE-17331987	Proteína de choque térmico, miembro 5 (655 aa)
prkcb	XB-GENE-6485749	Proteína quinasa C, beta (670 aa)
kcnj9	XB-GENE-5906252	Canal de potasio rectificador entrante (GIRK5) (422 aa)

rplp0	XB-GENE-17337446	Proteína ribosómica grande, 0 (314 aa)
tuba4b	XB-GENE-865914	Tubulina alfa 4b (449 aa)
aldoc	XB-GENE-1005029	Aldolasa, fructosa-bifosfato C (364 aa)
rpl13	XB-GENE-17337991	Proteína ribosomal L13 (211 aa)
phb2	XB-GENE-17343314	Prohibitina 2 (293 aa)
tubb	XB-GENE-864839	Beta tubulina, clase I (444 aa)
gapdh	XB-GENE-17335663	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (334 aa)
rps25	XB-GENE-17340107	Proteína ribosomal S25 (125 aa)
phb	XB-GENE-977676	Prohibitina 1 (272 aa)
cand1	XB-GENE-865787	Proteína 1 asociada a cullin, disociada de NEDD8 (1233 aa)
atp5f1b	XB-GENE-17340769	ATP sintasa (537 aa)

Se analizaron las 27 proteínas con el programa PANTHER GO-Slim para poder clasificarlas de acuerdo con las categorías de “Función molecular” (Figura 15), “Proceso biológico” (Figura 16), “Clase de proteína” (Figura 17) y “Vía de señalización” (Figura 18).

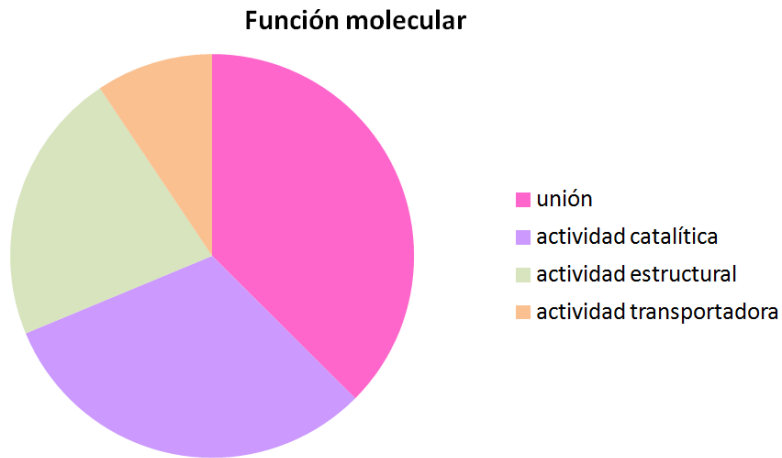


Figura 15. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las funciones moleculares de las 27 proteínas detectadas, agrupadas en las siguientes categorías: unión, actividad catalítica, actividad estructural molecular y actividad transportadora.

En la figura 15 las proteínas de unión son las proteínas de choque térmico, ATPasas, proteínas ribosomales (17A, S3, L13, P0 y L12), tubulinas y el factor de elongación 1 alfa; las proteínas con actividad catalítica son proteínas de choque térmico, proteína ribosomal S3, glucosidasa AB, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, factor de elongación 1 alfa, adenosilhomocisteinasa, proteína cinasa C y ubiquitina hidrolasa; proteínas ribosomales y tubulinas tienen la función de actividad estructural molecular, por último, las proteínas con actividad transportadora son las ATP sintasas y el canal GIRK5.

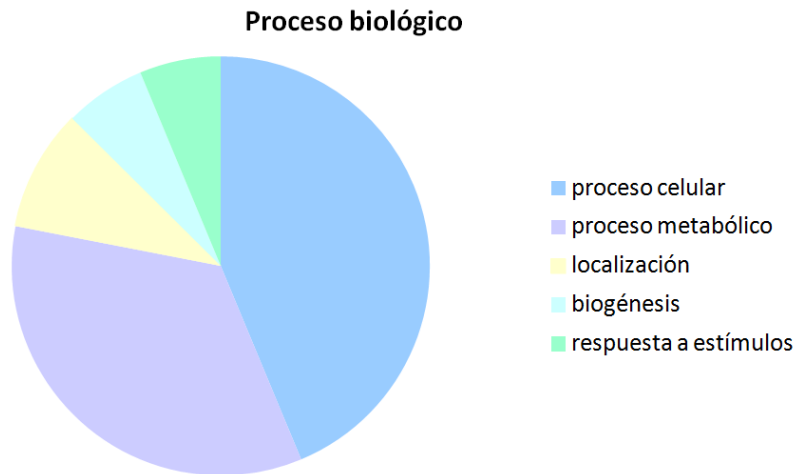


Figura 16. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran los procesos biológicos en los que están involucradas las 27 proteínas detectadas; agrupadas en las categorías: biogénesis, proceso celular, localización, proceso metabólico y respuesta a estímulos.

En la figura 16 en la categoría de proceso celular se encuentran las proteínas de choque térmico, prohibitinas, tubulinas, proteínas ribosomales, cand1, glucosidasa AB, GADPH, proteína cinasa C y adenosilhomocisteinasa; en proceso metabólico las proteínas prohibitina (1 y 2), proteínas ribosomales L12 y P0, glucosidasa AB, GADPH, ATP sintasa subunidad beta, piruvato carboxilasa, factor de elongación 1 alfa, adenosilhomocisteinasa y ubiquitina-carboxi terminal-hidrolasa; las proteína de choque térmico 1B, el canal GIRK5 y la proteína ATP sintasa están involucradas en procesos de localización; las proteínas ribosomales 17A y S8 están involucradas en procesos de biogénesis; por último, en la categoría de y respuesta a estímulos se encuentran las proteínas de choque térmico 1B y 5.

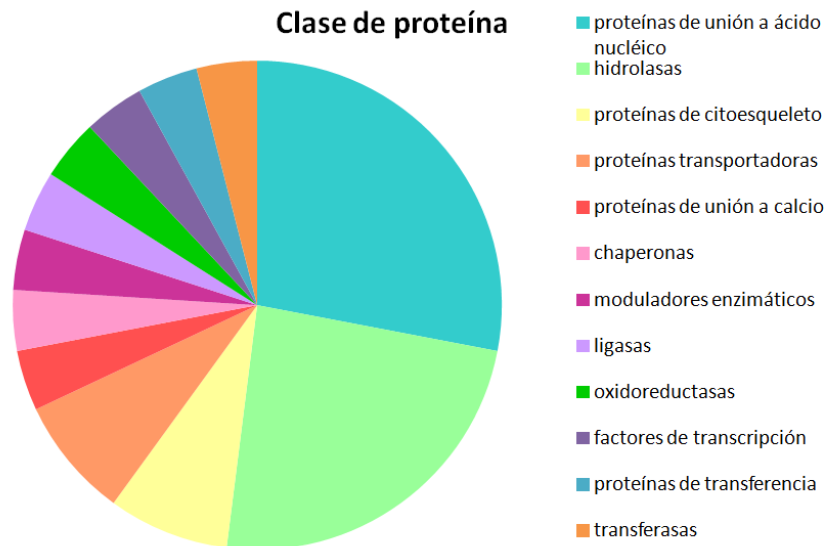


Figura 17. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las clases de proteínas que fueron detectadas: proteínas de unión a calcio, chaperonas, proteínas de citoesqueleto, modulador enzimático, hidrolasas, ligasas, proteínas de unión a ácido nucleico, oxidoreductasas, factores de transcripción, proteínas de transferencia, transferasas y proteínas transportadoras.

En la figura 17 la categoría proteínas de unión a calcio está formada por la proteína cinasa C; chaperonas por la proteína del complejo T; las proteínas de citoesqueleto son las tubulinas alfa y beta; el modulador enzimáticos es el factor de elongación 1 alfa; en la categoría de hidrolasas se encuentran las proteínas ATP sintasas alfa y beta, glucosidasa AB, factor de elongación 1 alfa, adenosilhomocisteinasa y ubiquitina hidrolasa; piruvato carboxilasa es la única ligasa; las proteínas de unión a ácido nucleico son las proteínas ribosomales L7A, L12, S3, L13, ATP sintasas alfa y beta y factor de elongación 1 alfa; la proteína oxidoreductasa es gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; el factor de transcripción es la proteína cand1; la proteína cinasa C entra en las categorías de proteínas de transferencia y transferasas, por último, las proteínas transportadoras son las ATP sintasas alfa y beta.



Figura 18 Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestran las vías de señalización en las que están involucradas las proteínas detectadas: Vía de señalización mediada por receptor de tipo 5HT2, síntesis de ATP, vía de la secretasa amiloide en enfermedad de Alzheimer, angiogénesis, vía de señalización de apoptosis, activación de células B, señalización de CCKR, regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa, vía de señalización del receptor de EGF, vía de señalización de endotelina, vía de señalización de FGF, metabolismo de fructosa y galactosa, glucólisis, vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, vía de señalización de proteína G heterotrimérica: vía mediada por Gq y Go, vía de señalización mediada por el receptor de histamina H1, enfermedad de Huntington, inflamación mediada por la vía de señalización de quimiocinas y citocinas, vía del receptor metabotrópico de glutamato del grupo I, vía de señalización del receptor muscarínico 1 y 3 de acetilcolina, vía de señalización mediada por el receptor de oxitocina, enfermedad de Parkinson, metabolismo de piruvato, vía de señalización del

receptor de hormona liberadora de tirotrópina, vía de señalización de VEGF y vía de señalización Wnt.

En la figura 18 la proteína cinasa C se encuentra en muchas categorías, entre ellas: vía de señalización mediada por receptor de tipo 5HT₂, vía de la secretasa amiloide en enfermedad de Alzheimer, angiogénesis, apoptosis (junto con las proteínas de choque térmico 1B y 5), activación de células B, señalización de CCKR, vía de señalización del receptor de EGF, vía de señalización de FGF, vía de señalización de endotelina, vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (junto con la proteína de unión a la caja Y), vía de señalización de proteína G heterotrimérica: vía mediada por G_q y G_o, vía de señalización mediada por el receptor de histamina, inflamación mediada por la vía de señalización de quimiocinas y citocinas, vía del receptor metabotrópico de glutamato del grupo I, vía de señalización del receptor muscarínico 1 y 3 de acetilcolina, vía de señalización mediada por el receptor de oxitocina, vía de señalización del receptor de hormona liberadora de tirotrópina, vía de señalización de VEGF y vía de señalización Wnt; en la categoría de síntesis de ATP se encuentran las ATP sintasas alfa y beta; regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa la proteína beta tubulina; metabolismo de fructosa y galactosa la proteína fructosa-bifosfato aldolasa; en la glucólisis intervienen las proteínas fructosa-bifosfato aldolasa y gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; en la enfermedad de Huntington están involucradas las proteínas beta tubulina y gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; en la enfermedad de Parkinson, las proteínas de choque térmico 1B y 5; por último, la proteína piruvato carboxilasa participa en el metabolismo de piruvato.

Se analizaron todas las proteínas obtenidas y, con base en la literatura, se eligieron las proteínas con mayor relevancia para el estudio.

- a) Las proteínas de choque térmico HSPA5 y HSP90B1 (proteína HSP90), también están presentes.
- b) Proteína prkcb (proteína cinasa C, beta):

La PKC tipo beta participa en varias funciones celulares como son: activación de células B, apoptosis, proliferación endotelial y absorción de azúcar en el intestino. Es de interés debido a los sitios potenciales de fosforilación que se pudieran encontrar en el canal GIRK5 por esta cinasa, ya que la fosforilación es importante para su actividad y tráfico celular. Además, en un estudio se evidencia el papel crucial de la isoforma PKC β en la inhibición de la corriente de potasio de rectificación entrante cardíaca generada por el heterodímero Kir2.1/Kir2.2 (52), por lo cual, esta proteína podría influenciar en la corriente de potasio generada por el canal GIRK5.

c) Ubiquitin hidrolasa UCHL3:

Esta enzima juega un papel en la remoción de las cadenas de ubiquitina de proteínas que se modifican postraduccionalmente por ubiquitinación, para dirigirse a su degradación en el proteosoma 26S. La UCHL3 se ha identificado en el huso meiótico de ovocitos de mono Rhesus. La inyección del inhibidor enzimático UBAL en el núcleo de los ovocitos, bloquea la progresión meiótica de los ovocitos más allá de la metafase I, además de generar anomalías en el huso y el primer cuerpo polar, de igual forma, la inyección de anticuerpos contra UCHL3 interrumpió la maduración de los ovocitos y causó anomalías meióticas (53). Para probar si dicho efecto ocurre en los ovocitos de *Xenopus*, usaremos inhibidores liposolubles de la UCHL3. Sin embargo, no hay reportes de que una UCH interaccione con un canal de potasio para su función.

d) Prohibitina 1 y prohibitina 2:

Por último y más sobresaliente, es la posible interacción del canal GIRK5 de la membrana plasmática con las proteínas prohibitina 1 y prohibitina 2. Se ha reportado la expresión de prohibitina 1 (PHB) en el folículo (54) y en las mitocondrias (55) de los ovocitos de mamíferos. Comúnmente las células del folículo están unidas a los ovocitos. El folículo es importante en la degeneración de los ovocitos por fagocitosis. La PHB mitocondrial es esencial en el destino de las células granulosas al inhibir la apoptosis.

Ambas proteínas (PHB y PHB2) forman un complejo proteico en mitocondria y membrana plasmática que pudiera funcionar como regulador de la progresión del ciclo celular, cumpliendo la función de receptor celular en la membrana plasmática, de una proteína aún desconocida (56). En otros estudios, la PHB2 de lamprea produjo la detención del ciclo celular (transición de fase G2/M) en células HeLa transfectadas, posiblemente mediado a través de la expresión de regulación negativa y el nivel de fosforilación de las proteínas del ciclo celular (57).

9.4. Proteínas encontradas en ambas muestras

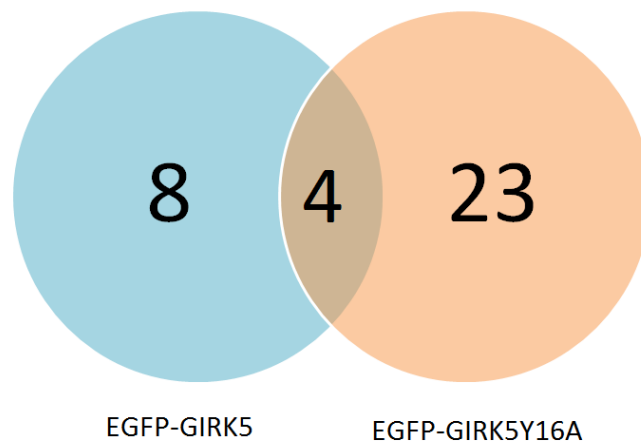


Figura 19. Diagrama de Venn donde se muestra el número de proteínas encontradas en el inmunoprecipitado del canal GIRK5-EGFP (círculo azul) y del canal GIRK5Y16A-EGFP (en rosa pálido). La intersección entre los dos círculos representa el número de proteínas que se encontraron en ambas muestras; y se trata de las proteínas ENSXETG00000002315, hspa1b, hspa5 y atp5b.

En la figura 19 se muestran las proteínas identificadas mediante los ensayos proteómicos. Se encontraron 4 proteínas que están presentes en ambas muestras.

9.5. Proteínas que interactúan con el canal GIRK5 en la rana *Xenopus tropicalis* reportadas hasta el momento

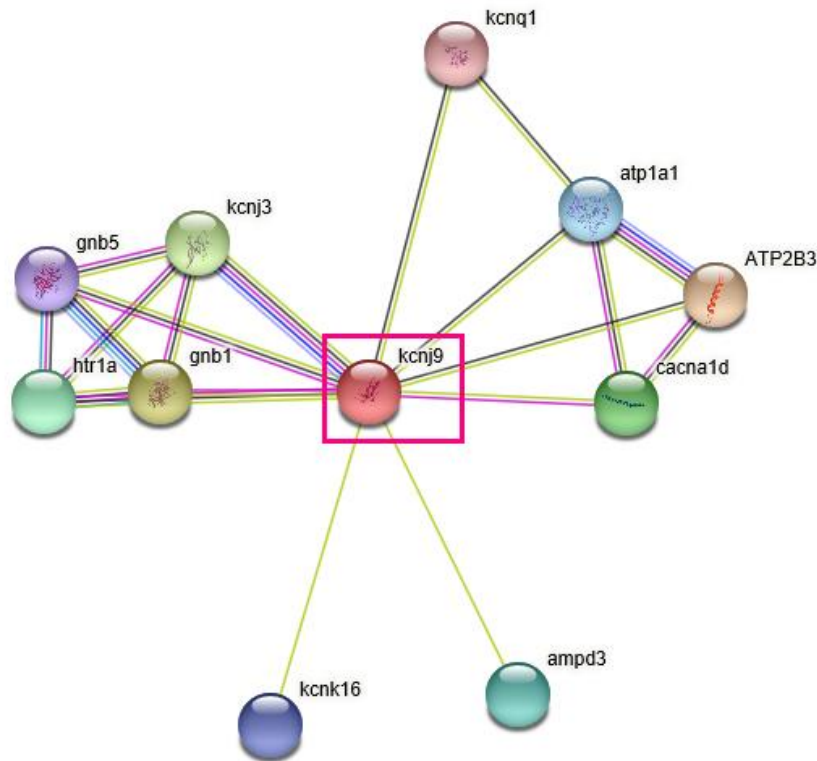


Figura 20. Interactoma del canal GIRK5 de la rana *Xenopus tropicalis* obtenido con el programa String. Cada esfera representa una de las 27 proteínas identificadas, la estructura en el interior de algunas significa que su estructura 3D se ha predicho o es conocida. Las líneas representan las interacciones proteína-proteína; las de color verde, indican que ambas proteínas se mencionan en un mismo texto; las azules, que se encuentran en bases de datos actualizadas; las rosas, que están determinadas con soporte experimental y las de color gris, indican que se trata de proteínas homólogas. KCNJ9 (la esfera señalada en el recuadro rojo) es el gen que codifica para el canal GIRK5.

En la figura 20, se describen los genes que codifican para las proteínas reportadas hasta el momento, que tienen interacción con el canal GIRK5, como: ATP2B3 (ATPasa), gnb1 (proteína de unión al nucleótido guanina), kcnj3 (canal de potasio rectificador entrante, miembro 3), cacna1d (canal de calcio voltaje-dependiente), htr1a (receptor a serotonina),

ampd3 (AMP deaminasa), atp1a1 (ATPasa), kcnk16 (canal de potasio, subfamilia K, miembro 16), gnb5 (proteína de unión al nucleótido guanina) y por último el gen kcnq1 que codifica para un canal de potasio dependiente de voltaje.

9.6. Discusión general

Cada vez es más común encontrar diversos trabajos sobre proteómica, con el fin de conocer todas las proteínas de una célula, tejido u orgánulo específico; principalmente involucrados con alguna patología de importancia en la actualidad; en diferentes modelos animales y en líneas celulares, sin embargo, para el modelo de ovocito de *Xenopus laevis*, sólo se han hecho algunos ensayos de proteómica cuantitativa.

Este trabajo es el primero que se realiza de proteómica funcional en ovocitos de rana, usando como muestra un inmunoprecipitado, además de que el ensayo se realizó en las células en las que se encuentra el canal endógenamente. Cabe señalar que los ensayos se llevaron a cabo con el anticuerpo anti EGFP, debido a que en el laboratorio no se contaba con el anticuerpo para el canal GIRK5 endógeno, por lo tanto, se llevó a cabo la sobreexpresión del canal unido a la EGFP.

Las muestras analizadas fueron inmunoprecipitados compuestos por los complejos inmunes, formados entre el anticuerpo anti EGFP y los canales GIRK5-EGFP y GIRK5Y16A-EGFP, respectivamente, proteínas que interactúan directa o indirectamente con dichos canales, además de proteínas que pudieran interactuar con la proteína EGFP; por lo tanto, es necesario confirmar el tipo de interacción que presentan las proteínas de interés con los canales y eliminar a las que interactúan con la EGFP.

Debido a que el proteoma es variable, sería conveniente estudiarlo en otras condiciones, como en distintos estadios de ovogénesis y en condiciones de maduración, para poder comprender mejor las posibles vías de señalización de dicho canal.

Para continuar con el proyecto y llegar a dilucidar las vías de señalización del canal GIRK5 en sus dos localizaciones, sería conveniente realizar ensayos funcionales para cada una de las proteínas de interés en el modelo de ovocito de rana *Xenopus laevis*.

10. Conclusiones

Se identificaron 11 proteínas con una interacción potencial con el canal GIRK5 y 26 proteínas con el canal GIRK5Y16A, en el modelo de ovocito de la rana *Xenopus laevis*. De acuerdo con las bases de datos utilizadas para el análisis, ninguna proteína identificada presenta una interacción directa con el canal, lo que significa que hasta ahora ninguna ha sido reportada. Sin embargo, se planea realizar ensayos funcionales en ovocitos para confirmar o descartar alguna de estas predicciones. Las proteínas que se seleccionaron como “de mayor relevancia para el estudio” son proteínas implicadas en procesos de proliferación y tráfico celular por lo que su relación con el canal GIRK5 en cualquiera de sus dos localizaciones será sumamente relevante para comprender las vías de señalización en las que participa el canal de potasio GIRK5 en un modelo de ovocito de rana.

11. Perspectivas

A partir del análisis de los interactomas de GIRK5, será necesario:

11.1. Para el canal GIRK5

- Confirmar la expresión de las proteínas detectadas, mediante ensayos de western blot.

- Determinar la interacción del GIRK5 de retículo endoplásmico con las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90. Se propone realizar ensayos con inhibidores como gendalmicina, y verificar si resulta alterada la maduración de los ovocitos. Para el canal de membrana se realizarán los mismos ensayos.
- Estudiar la interacción del canal GIRK5 con la proteína pa2g4 mediante ensayos de inmunoprecipitación para identificar si el canal GIRK5 forma parte de la vía de señalización del receptor ErbB-3.
- Confirmar si el canal GIRK5 se localiza también en mitocondria. Se propone realizar ensayos de western blot con muestras de mitocondria de ovocito. De ser así, realizar ensayos de inmunoprecipitación de las prohibitinas 1 y 2 con el canal GIRK5.

11.2. Para el canal GIRK5Y16A

- Analizar los sitios potenciales de fosforilación por la cinasa PKC tipo beta, de encontrarse algún sitio en el canal GIRK5, realizar ensayos funcionales con un inhibidor de la PKC (G06983).
- Verificar la interacción entre el canal de membrana y la proteína UCHL3. Se propone realizar ensayos utilizando inhibidores liposolubles de dicha proteína, como ubiquitina aldehído, y así poder verificar si presenta el mismo efecto de bloqueo de la progresión meiótica observado en los ovocitos de mono rhesus (53).
- Debido a que acabamos de obtener en el laboratorio un anticuerpo policlonal para el canal GIRK5 silvestre, se realizará el estudio proteómico para poder comparar los resultados con los obtenidos en este trabajo con los canales recombinantes.

12. Referencias

- 1) Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular J. TAMARGO MENÉNDEZ AN. R. ACAD. NAC. FARM. 12. Consultada en: <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/227/258>, el 8 de agosto de 2019.
- 2) Hille B., (2001) Ionic channels of excitable membranes. third edition. USA, Sinauer Associates. pp: 314
- 3) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2004). Molecular Biology of the Cell. 5° Ed. Garland Science. USA. pp: 1463
- 4) Biggin, P. C., Roosild, T., & Choe, S. (2000). Potassium channel structure: domain by domain. Current Opinion in Structural Biology.
- 5) Doyle D.A., Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chair, B.T. y MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science. 280: 69
- 6) Bichet, D., Hass, F.A., y Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. Nat. Rev. Neurosci. 4: 957-67.
- 7) Lu, Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. Annu. Rev. Physiol. 66: 103-29.
- 8) Ruppertsberg, J. (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channel. Pflugers Arch. 441: 1-11
- 9) Hagiwara S, Takahashi K. (1974). The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J Membr Biol.* 18(1):61–80.
- 10) Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP. Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol.* (1976) 67(6):621–638).
- 11) Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev* 90(1): 291-366.

- 12) O'Connor C & Adams J. (2010). *Essentials of Cell Biology* Cambridge, MA: NPG Education, Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997540> Revisado el 19 de septiembre de 2019.
- 13) Zhang, Dandan; Zhao, Qiang; Wu, Beili (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol Cells*, Korean Society for Molecular and Cellular Biology 38 (10): 836-842
- 14) G protein-coupled receptors. Disponible en: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/GPCRs.htm>, revisado el 19 de septiembre de 2019.
- 15) Miriam Ruiz Ballester. (2013). Las proteínas G, receptores acoplados y el Nobel de química. *Journal of Feelsynapsis (JoF)*. ISSN 2254-3651. (8): 85-89
- 16) Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249-257.
- 17) Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159.
- 18) Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter dd, Nathanson NM, Hille B. (1985). GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature*. 317(6037):536-8.
- 19) Zhang, Q., Pacheco, M. y Doupnik, C. (2002) Gating properties of GIRK channels activated by Galpha(o)- and Galpha(i)-coupled muscarinic m2 receptors in *Xenopus* oocytes: the role of receptor precoupling in RGS modulation. *J. Physiol*. 545:355-73.
- 20) Wettschureck, N. y Offerman, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific function. *Physiol. Rev*. 85:1195-204.
- 21) Kubo, Y., Baldwin, TJ., Jan, YN., Jan LY (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362(6416):127-33.
- 22) Krapivinsky G., Gordon, EA., Wickman K., Velimirovic B, Krapivinsky L., Clapham DE. (1995). The G-protein-gated atrial K^+ channel IKACH is a homomultimer of two inwardly rectifying K^+ channel proteins. *Nature* 374 (6518): 135-41.
- 23) Lesage F. Guillemare E. Fink M. Duprat F. Heurteaux C. Fosset M. Romey G. Barhanin J. Lazdunski M (1995). Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K^+ channels. *J Biol. Chem* 270(48):28660-7.

- 24) Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. (1996). Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K^+ channel subunit that permits GIRK1 expression of IKACH currents in oocytes. *Neuron* 16:423-9.
- 25) Mulatero, P., Monticone, S., Bertello, C., Viola, A., Tizzani, D., Iannaccone, A. Veglio, F. (2013). Long-Term Cardio- and Cerebrovascular Events in Patients with Primary Aldosteronism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(12), 4826–4833
- 26) Dhar, M. S., & Plummer, H. K. (2006). Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiology*, 6(1), 8.
- 27) Hedin KE, Lim NF, Clapham DE (1996). Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K^+ channel subunit that permits GIRK1 expression of IKACH currents in oocytes. *Neuron* 16; 423-9.
- 28) Lutz LB, Kim B, Jahani D, Hammes SR (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J Biol Chem* 275:41512-20.
- 29) R. Schmitz, G. Baumann, H. Gram, (1996). Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J. Mol. Biol.*, 260, 664– 677.
- 30) Díaz-Bello B, Rangel-García CI, Salvador C, Carrisoza-Gaytán R, Escobar LI (2013). The polarization of the G-protein activated potassium channel GIRK5 to the vegetal pole of *Xenopus laevis* oocytes is driven by a di-leucine motif. *PLoS One*. 2013 May 22;8(5): e64096
- 31) Mora SI, Escobar LI. (2005). Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett*. 2005 Jun 6;579(14):3019-23
- 32) W.-M. Weber, (1999). Endogenous Ion Channels in Oocytes of *Xenopus laevis*: Recent Developments. *J. Membrane Biol*. 170, 1–12
- 33) Tammaro P., Shimomura K., Proks P. (2008). *Xenopus* Oocytes as a Heterologous Expression System for Studying Ion Channels with the Patch-Clamp Technique. In: Lippiat J.D. (eds) Potassium Channels. *Methods in Molecular Biology*, vol 491. Humana Press

- 34) Merriam RW, Sauterer RA, Christensen K. (1983). A subcortical, pigment-containing structure in *Xenopus* eggs with contractile properties. *Dev Biol.* 95(2):439-46.
- 35) Kloc M, Bilinski S, Chan AP, Etkin LD (2001). Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation* 67: 80–83.
- 36) King ML, Messitt TJ, Mowry KL (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell* 97: 19–33
- 37) Method of the Year 2012. (2013). *Nature Methods*, 10(1), 1–1. doi:10.1038/nmeth.2329
- 38) L.-R. Yu., N. A. Stewart y Veenstra, T. D. (2010). Chapter 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. En Geoffrey S. Ginsburg and Huntington F. Willard. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*, pp. 89–96. Elsevier.
- 39) Daniela Morales, Lilí Gallo (2006). Plataformas de proteómica. Instituto de biotecnología, UNAM. Disponible en: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf
Consultado el 11 de septiembre de 2019
- 40) A.C. Gavin, M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415, pp. 141-147
- 41) Keerthikumar, S. (2017). An Introduction to Proteome Bioinformatics. *Proteome Bioinformatics. Methods Mol Biol.* 2017; 1549:1-3.
- 42) Gregory-Evans, K., Pennesi, M. E., & Weleber, R. G. (2013). Retinitis Pigmentosa and Allied Disorders. *Retina*, 761–835.
- 43) Alonso-López D, Gutiérrez MA, Lopes KP, Prieto C, Santamaria R, De Las Rivas J (2016). Interactomes APID: proporcionando interactomas basados en proteoma con calidad controlada para múltiples especies y redes derivadas. *Ácidos Nucleicos Res .* 44 (W529–35): W529–35
- 44) Feng, P.-F., Zhang, B., Zhao, L., Liu, Y., Wang, J.-N., Xu, X.-Q., Li, B.-X. (2019). Intracellular mechanism of rosuvastatin-induced decrease in mature hERG protein expression on membrane. *Molecular Pharmaceutics. Mol Pharm.* 1;16(4):1477-1488.

- 45) Ficker, E. (2003). Role of the Cytosolic Chaperones Hsp70 and Hsp90 in Maturation of the Cardiac Potassium Channel hERG. *Circulation Research*, 92(12), 87e–100.
- 46) Hirota, Y., Kurata, Y., Kato, M., Notsu, T., Koshida, S., Inoue, T., Hisatome, I. (2008). Functional stabilization of Kv1.5 protein by Hsp70 in mammalian cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(3), 469–474
- 47) Black, L., Longo, J. F., & Carroll, S. L. (2019). Mechanisms of receptor tyrosine-protein kinase ERBB3 Action in Human Neoplasia. *The American Journal of Pathology. The American Journal of Pathology*. 189(10), pp 1898-1912.
- 48) Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A. K., & Batra, S. K. (2012). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 15–31
- 49) Squatrito, M., Mancino, M., Sala, L., & Draetta, G. F. (2006). Ebp1 is a dsRNA-binding protein associated with ribosomes that modulates eIF2 α phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 859–868.
- 50) Mao, J., O’Gorman, C., Sutovsky, M., Zigo, M., Wells, K. D., & Sutovsky, P. (2018). Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Uba52) is essential for preimplantation embryo development. *Biology Open*, bio.035717. 7(10).
- 51) Kitoh, R., Oshima, A., Suzuki, N., Hashimoto, S., Takumi, Y., & Usami, S. (2007). Immunocytochemical localization of ubiquitin A-52 protein in the mouse inner ear. *NeuroReport*, 18(9), 869–873
- 52) Scherer, D., Seyler, C., Xynogalos, P., Scholz, E. P., Thomas, D., Backs, J., ... Zitron, E. (2016). Inhibition of Cardiac Kir Current (IK1) by Protein Kinase C Critically Depends on PKC β and Kir2.2. *PLOS ONE*, 11(5), e0156181
- 53) Mtango, N. R., Sutovsky, M., VandeVoort, C. A., Latham, K. E., & Sutovsky, P. (2012). Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2022–2029
- 54) Thompson, W. E., Asselin, E., Branch, A., Stiles, J. K., Sutovsky, P., Lai, L., Tsang, B. K. (2004). Regulation of Prohibitin Expression During Follicular Development and Atresia in the Mammalian Ovary¹. *Biology of Reproduction*, 71(1), 282–290.

- 55) Mishra, S., Murphy, L. C., & Murphy, L. J. (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 353–363
- 56) Mishra, S., Murphy, L. C., Nyomba, B. L. G., & Murphy, L. J. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 11(4), 192
- 57) Shi, Y., Guo, S., Wang, Y., Liu, X., Li, Q., & Li, T. (2018). Lamprey Prohibitin 2 Arrest G2/M Phase Transition of HeLa Cells through Down-regulating Expression and Phosphorylation Level of Cell Cycle Proteins. *Scientific Reports*, 8(1)

13. Anexo de protocolos

13.1 Transcripción *in vitro*

Se linearizaron los plásmidos que contienen el ADNc del canal GIRK5 wt y la mutación Y16A utilizando 16.5 μ L y 8.5 μ L de ADN, respectivamente, 2 μ L del buffer 10x correspondiente y 1.5 μ L de enzima de restricción Mlu-I para llegar a un volumen de reacción final de 20 μ L (con agua grado biología molecular), se incubó durante 4 horas a 37°C, posteriormente se comprobó en un gel de agarosa al 1% que el ADN se haya linearizado; enseguida se adicionaron 1 μ L de EDTA 0.5 M, 2 μ L de acetato de amonio y 44 μ L de etanol al 100%, se incubó durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos y se recuperó el precipitado retirando el exceso de etanol; una vez seco, se resuspendió el precipitado en 6 μ L de agua grado biología molecular y se comprobó la linearización del ADN con un gel de agarosa.

Para la reacción de transcripción se agregaron los siguientes reactivos en un tubo de 1.5 mL:

10 μ L de 2X NTP/Cap

2 μ L de buffer de reacción 10x

6 μ L del ADN lineal

2 μ L de enzima SP6

1 μ L de GTP

Se incubó a 37°C durante 2 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se agregó al tubo de reacción 1 μ L de DNAsa y se incubó 15 min más a 37°C, para eliminar el ADN que no se transcribió.

Para precipitar el ARN se agregaron a la reacción 30 μ L de agua libre de nucleasas y 25 μ L de solución de precipitación LiCl. Se incubó a -20°C por 30 min y posteriormente se

centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 15 min. El pellet resultante se lavó con 1 mL de EtOH al 70% y se eliminó el EtOH secando al aire. Se resuspendió el pellet en medio ND96, se determinó la concentración y finalmente se guardó la muestra a -70°C.

13.2 Cuantificación de proteínas.

Realizar un stock de disolución de albúmina de concentración 2 mg/mL.

Hacer una curva patrón de albúmina de acuerdo con la siguiente tabla

Concentración de albúmina (mg/mL)	Volumen del stock de albúmina (µL)	Volumen de SSI (µL)
2.0	--	--
1.5	12 de 2 mg/mL	4
1.0	17 de 2 mg/mL	17
0.5	17 de 1 mg/mL	17
0.25	17 de 0.5 mg/mL	17
0.125	17 de 0.25 mg/mL	17
0.06	17 de 0.125 mg/mL	17
Blanco	--	10

Las muestras se diluyen con SSI en una proporción 1:5 (3 µL de muestra más 12 µL de SSI).

Se utilizan 5 de µL de cada disolución de la curva patrón y de las muestras por triplicado.

Adicionar a cada pozo 25 µL de reactivo A del kit BioRad DC Protein Assay. Incubar 5 minutos a TA.

Agregar a cada pozo 200 μ L del reactivo B del kit e incubar 30 minutos a TA en agitación leve en ausencia de luz.

Leer absorbancias a 750 nm.

13.3 Preparación de solución ND96 sin calcio.

Para preparar 2 L colocar las siguientes cantidades en un vaso de precipitados de 1 L:

Todos los reactivos se encuentran en una concentración de 1 M.

192 mL NaCl

4 mL KCl

10 mL HEPES

2 mL MgCl₂

5 mL piruvato de sodio

Agregar el volumen suficiente de agua desionizada para poder ajustar pH a 7.4, posteriormente llevar al aforo en un matraz volumétrico de 2 L y finalmente filtrar.

Para preparar el ND96 con calcio, es necesario agregar 3.6 mL de CaCl₂ a la solución anterior.

Finalmente, se requieren 625 μ L de gentamicina por cada 500 mL de solución ND96.

13.4 Preparación de buffer de extracción de proteínas

Para preparar 100 mL, poner en un vaso de precipitados de 100 mL:

8.55 g sacarosa (250 mM)

0.03722 g EDTA (1 mM)

12.41 g tris (1 mM)

60 mL de agua desionizada

Ajustar pH a 7.6 y llevar al aforo en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 1% de NP-40.

13.5 Preparación de buffer de lavado

Para preparar 200 mL, pesar 2.2114 g de tris (50 mM), agregar 100 mL de agua destilada y ajustar pH a 8 con HCl. Finalmente llevar al aforo en un matraz volumétrico de 200 mL con agua destilada.

13.6 Preparación de buffer salino tris (TBS) 5X

Para preparar 1 L, pesar 40 g de NaCl y 12.11 g de trisma base. Agregar 500 mL de agua destilada y ajustar pH a 7.6 con HCl. Llevar al aforo en un matraz de 1 L y filtrar.

Para los lavados se utiliza el buffer en una concentración de 1X y se agrega 1 mL de tween 20 por cada litro de buffer (TBS-T).

13.7 Preparación de solución de bloqueo

Para preparar 20 mL: agregar 20 mL de buffer TBS-T y 1 g de leche libre de grasa (blotting-grade blocker Bio-Rad).

13.8 Preparación de geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor para electroforesis

- Gel separador al 10% (Para preparar 2 geles)

4.0 mL de agua bidestilada

3.3 mL de acrilamida al 30%

2.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8)

0.1 mL de SDS al 10%

0.1 mL de persulfato de amonio al 10%

0.004 mL de TEMED

- Gel concentrador (para 2 geles)

2.7 mL de agua bidestilada

0.67 mL de acrilamida al 30%

0.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8)

0.04 mL de SDS al 10%

0.04 mL de persulfato de amonio al 10%

0.004 mL de TEMED

Preparar los vidrios para el gel y colocar primero 4 mL de la solución para el gel separador, una vez que polimerice, se ponen 2 mL de la solución del gel concentrador y finalmente se pone el peine para formar los pozos.

13.9 Preparación de disoluciones para electroforesis

13.9.1 Preparación de buffer para electroforesis 5x (SDS-Tris-glicina)

15.1 g de Tris base

72 g de Glicina

5 g de SDS

Llevar al aforo con agua a 1 L. Se puede almacenar a 4 °C.

13.9.2 Preparación de buffer de transferencia para preparar 1L

0.303 g de Tris base

1.44 g de Glicina

20 mL de metanol

Llevar al aforo con agua bidestilada a 1 L.

13.9.3 Preparación de buffer TBS

NaCl 137 mM

Tris base 20 mM

Ajustar pH a 7.6

TBS-T: Para un litro de TBS agregar 1 mL de Tween 20.

13.10 Revelado del Western Blot

13.10.1 Preparación del reactivo Quimioluminiscente.

Preparar una porción 1:1 del reactivo luminol con peróxido.