



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Clonación y caracterización de la estequiometría
del canal de protones H_v1 del coral *Acropora millepora*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Miguel Ángel Cervantes Rocha



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Gisela Edith Rangel Yescas
Ciudad Universitaria, CDMX 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Cervantes
Rocha
Miguel Ángel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312236492

2. Datos del Tutor

Dra.
Rangel
Yescas
Gisela Edith

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Hernández
Cruz
Arturo

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Nishigaki
Shimizu
Takuya

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Fiordelisio
Coll
Tatiana

6. Datos del sinodal 4

Dr.
López
Vera
José Estuardo

7. Datos del trabajo escrito

Clonación y caracterización de la estequiometría del canal de protones H_v1 del coral
Acropora millepora.
77 pp.
2021

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de Biofísica molecular de canales iónicos, a cargo del Dr. León D. Islas Suárez, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. Este trabajo fue financiado por el proyecto: “El papel de los canales iónicos permeables a protones en la fisiología del coral *Acropora*”. PAPIIT: IN215621.

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias y Facultad de Medicina por haberme acogido e instruido en este largo camino académico.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas por su guía, corrección y asesoría en este proyecto.

Al Dr. León D. Islas por permitir la realización de la tesis en su laboratorio, por sus aportaciones y valiosos consejos a este proyecto.

A la C.D María José Gómora Herrera por ayudarme en la obtención de las fotografías en microscopía confocal.

A los doctores Arturo Hernández Cruz, Takuya Nishigaki Shimizu, Tatiana Fiordelisio Coll y José Estuardo López Vera por ser parte de mi jurado y dedicar parte de su tiempo en la lectura y corrección de esta tesis.

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres Socorro Rocha Nava y Miguel Ángel Cervantes Guadarrama por su cariño y enseñanzas a lo largo de estos 25 años de vida, a pesar de las dificultades presentadas sé que cuento con su apoyo ya sea desde el Cielo o aquí en la Tierra.

A mi hermana Karen por ser mi confidente y cómplice en todas mis aventuras, por regañarme y brindarme su cariño cuando era necesario pero sobre todo por todas las ocurrencias que tiene, contigo la vida es más divertida.

A mi hermana mayor Marlenne por enseñarme sus cultivos de hongos y bacterias que hacía en la facultad e iniciarme de cierta manera al mundo de la biología a mis 6 años.

A mi sobrino Lunetón por enseñarme el maravilloso mundo de Baby Shark.

A Carolina Franco por todas esas pláticas sobre política, derecho, filosofía, metafísica y contribuir al desarrollo de mi pensamiento crítico y social.

A Opo, Milo, Ceviche, Napo, Lili, Cheto, Ut veraniego, Pipesk, Odapas, Loma y Pachón por brindarme el amor más puro que puede existir, el de una mascota, son y fueron mis grandes compañeros de vida.

De nuevo a mi tutora Gis, por ser como una segunda mamá (académica), por su infinita paciencia y sus enseñanzas tanto de vida como académicas, gracias por completar mi formación como biólogo y por estos años de amistad, un poco tarde pero se lograron esos mixiotes.

A mis amigos del laboratorio Maru, Teriws, Ceci, Ana, Miriam y Don Esteban por todas esas pláticas, convivencias, risas, ustedes hicieron divertidos todos esos días en el lab.

A mi amiga de la facultad Zyan, eres un amor de persona, gracias por estar ahí en los momentos más oscuros y difíciles de mi vida, por ser tan espontánea y natural, nunca olvidaré la manera en que nos conocimos.

A mis grandes amigos de la prepa Carlos, Julián, Daniel y Paulina por brindarme su amistad, con cada uno tengo anécdotas bastante memorables, con ustedes viví los mejores tres años de preparatoria.

A mis amigos más antiguos Juan, Toño e Israel por siempre estar ahí, sin importar la frecuencia con que nos vemos sé que puedo contar con ustedes, no cualquiera puede decir que tiene conserva a sus amigos desde los 5-7 años.

Por ultimo pero no menos importante, a Fátima, te convertiste poco a poco en una persona sumamente importante y especial para mí, gracias por todos estos años de convivencia, por tu cariño, sinceridad, apoyo y por todas esas noches platicando contigo hasta las 7 a.m, no cambiaría nada de nuestra historia, incluyendo esas 5 veces. “Estamos hechos de partículas que han existido desde que surgió el universo. Me gusta pensar que para crearnos esos átomos viajaron 14 mil millones de años a través del tiempo y el espacio para que así podamos estar juntos y formar un todo”.

“La ciencia es un viaje que inicia en la ignorancia y culmina en el conocimiento, de lo desconocido a la iluminación”

-El experimento fantasma-

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 CORALES.....	3
2.2 IMPORTANCIA DE LOS CORALES.....	4
2.3 CALCIFICACIÓN.....	5
2.4 CALCIFICACIÓN EN CORALES.....	6
2.5 CANAL Hv1 Y LA CALCIFICACIÓN.....	9
2.6 CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE.....	10
2.7 CANAL IÓNICO DE PROTONES Hv1.....	12
2.8 POSIBLE FILTRO DE PROTONES Y MECANISMO DE TRANSPORTE.....	12
2.9 MODULACIÓN POR EL PH.....	14
2.10 DIMERIZACIÓN DEL CANAL Hv1.....	16
2.11 ACROPORA MILLEPORA.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODO	23
6.1 IDENTIFICACIÓN DE LA POSIBLE SECUENCIA DEL CANAL Hv1 PUTATIVO DE <i>ACROPORA MILLEPORA</i> Y DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	23
6.2 EXTRACCIÓN DE ARNTOTAL DE <i>ACROPORA MILLEPORA</i>	24
6.3 AMPLIFICACIÓN DEL PUTATIVO CANAL Hv1 POR RT-PCR.....	24
6.4 OBTENCIÓN DE LAS FUSIONES AMHv1 Y AMHv1ΔC CON LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES CERULEAN Y CITRINE.....	26
6.5 EXPRESIÓN DE LAS CUATRO CONSTRUCCIONES EN CÉLULAS HEK293.....	28
6.6 ELECTROFISIOLOGÍA.....	29
6.7 OBTENCIÓN DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	31
6.8 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	32
6.9 FRET.....	33
6.10 ADQUISICIÓN DE DATOS FRET.....	35
7. RESULTADOS	40
7.1 IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL CANAL Hv1 DE <i>ACROPORA MILLEPORA</i>	40
7.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL CANAL Hv1 DE <i>ACROPORA MILLEPORA</i>	41
7.3 OBTENCIÓN DE LA FUSIÓN DEL CANAL AMHv1 Y AMHv1ΔC CON LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES CERULEAN Y CITRINE.....	46
7.4 DISTRIBUCIÓN DEL CANAL AMHv1 EN CÉLULAS HEK293.....	48
7.5 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	51
7.6 EFICIENCIA APARENTE DE FRET.....	52
8. DISCUSIÓN	61
8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SECUENCIA AMHv1.....	61
8.2 ELECTROFISIOLOGÍA DE AMHv1.....	63

8.3 FLUORESCENCIA Y ESTEQUIOMETRÍA DEL CANAL AMH _v 1	65
9. CONCLUSIONES	69
10. PERSPECTIVAS	70
11. REFERENCIAS	71

1. Resumen

La proteína Hv1 es un canal de protones activado por voltaje, es modulado por la diferencia en la concentración de pH intracelular y extracelular, y es inhibido por zinc. Cada subunidad presenta cuatro segmentos transmembranales (S1-S4), los cuales conforman el dominio sensor de voltaje (VSD) y al mismo tiempo el poro del canal; además presenta su dominio Amino y Carboxilo terminal en la región intracelular.

Los canales Hv1 generalmente se expresan como un dímero, cada subunidad presenta su propio poro de conducción, sin embargo, se ha descrito la existencia de una cooperatividad entre las dos subunidades durante el mecanismo de apertura o "*gating*". Existen evidencias que el dominio C terminal está implicado en la dimerización del canal.

Dicha proteína ha sido identificada en diferentes organismos a lo largo de la escala evolutiva y participa en la regulación del pH celular. Uno de los procesos biológicos en lo que se le ha visto relacionado es en la calcificación, de manera particular en cocolitóforos. Otros de los organismos que también llevan a cabo la calcificación son los corales, sin embargo, en estos organismos aún no se tiene claro cuál es la maquinaria que participa en dicho proceso químico y de manera puntual se desconoce si también expresan el canal Hv1.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y clonar el posible canal de protones Hv1 expresado en *Acropora millepora* y realizar la caracterización de la estequiometría del mismo. Utilizando técnicas de biología molecular se logró clonar el canal Hv1 del coral perteneciente a la especie *Acropora millepora* en el vector pcDNA3.1 para su expresión heteróloga en células HEK293.

Con la finalidad de conocer la estequiometría del canal, se realizaron construcciones del canal Hv1 con las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine. Dichas construcciones fueron caracterizadas por medio de la técnica de Transferencia de energía por resonancia de Fluorescencia (FRET). Para estudiar el papel del dominio C terminal en la estequiometría del canal, se realizaron otras dos construcciones del canal Hv1 con las mismas proteínas fluorescentes, pero en dichas construcciones se eliminó el C terminal del canal.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este proyecto podemos decir que: a) El coral *A. millepora* expresa el canal Hv1; b) Dicho canal se distribuye en la membrana celular y es funcional al expresarlo en células HEK293; c) De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la técnica de FRET, el canal Hv1 de *A millepora* se expresa como un dímero; y d) El dominio C terminal no parece ser fundamental en la formación del canal dimérico.

Finalmente podemos decir que, este proyecto sienta las bases para futuros estudios que permitan conocer el papel que juega el canal Hv1 en el proceso de calcificación en coral y por otra parte contribuye con el estudio de la relación estructura-función de dicho canal.

2. Introducción

2.1 Corales

Los corales son animales marinos pertenecientes al Filo Cnidaria. Su forma básica denominada pólipos, presenta un cuerpo tubular con una boca rodeada de tentáculos urticantes. Los pólipos de coral son normalmente pequeños, muchas especies han desarrollado la capacidad de vivir en colonias y construir esqueletos calcáreos protectores los cuales forman arrecifes (Brusca *et al.*, 2003).

En general los animales pertenecientes al Filo Cnidaria presentan un verdadero tejido epidermal (Figura 1), este tejido está compuesto por dos capas de células epiteliales, el ectodermo y el endodermo, que como su nombre lo dice, el primero se encuentra en la parte más externa y el segundo en la parte más interna del organismo. Estas capas celulares se encuentran separadas por una matriz extracelular de colágeno denominada mesoglea dividida en dos regiones: aboral y oral, siendo la primera la que se encuentra en la parte más próxima al esqueleto y la segunda próxima al medio externo (agua de mar), esta división está dada por una estructura conocida como celenteron (Allemand *et al.*, 2011).

Es importante señalar que existe un tejido que se encuentra alrededor del esqueleto, en una zona contigua a la región aboral, esta capa celular es la más delgada de todas las demás y recibe el nombre de ectodermo calicoblástico, debido a que las células que lo componen son precisamente los calicoblastos (Allemand *et al.*, 2011).

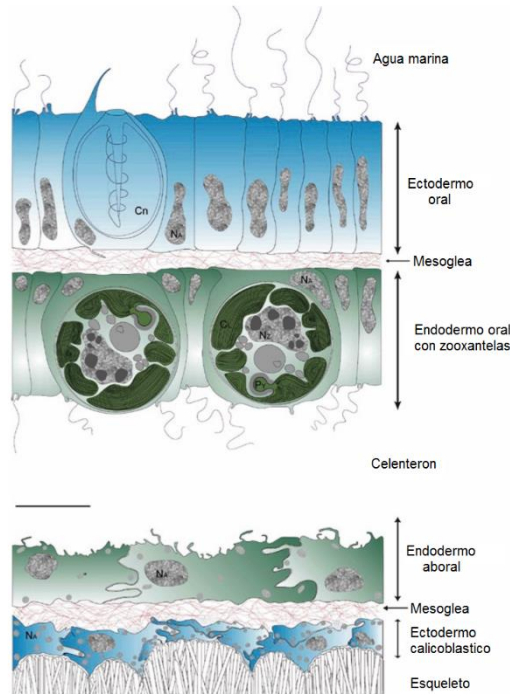


Figura 1. Esquema de la anatomía del coral. Representación de las diferentes capas que conforman el tejido epitelial de un coral, como se muestra, se encuentra dividido en ectodermo y endodermo que a su vez se dividen en la parte oral y aboral separados por la mesoglea y el celenteron respectivamente (Modificado de Allemand et al., 2011).

2.2 Importancia de los corales

Los arrecifes coralinos no solamente están constituidos por corales, sino que lo conforman una gran diversidad de peces, esponjas, moluscos, crinoideos, etc., por lo mismo los arrecifes de coral son considerados como un ecosistema en sí (Allemand *et al.*, 2011).

Al ser un ecosistema, los arrecifes coralinos proveen refugio a las diferentes organismos antes mencionados, además también funcionan como biofiltros, filtrando el plancton de las grandes cantidades de agua marina que pasan a través de ellos, obteniendo además nutrientes y carbono (Erez, 1990).

Una de las funciones más importantes que tienen los arrecifes de coral es la de precipitar el CaCO_3 a una velocidad mayor que las tasas de erosión biológica,

química y física a la que están expuestos, esta precipitación permite el crecimiento y expansión de corales lo que a su vez les permite hacer frente a diversos cambios como al aumento del nivel del mar o al hundimiento del sótano (Hutchings *et al.*, 2005).

Por mencionar algunos de los beneficios que proveen los arrecifes de coral a la humanidad están: el ser la fuente de alimento para millones de habitantes en el mundo y reciclar el CO₂ atmosférico (Von Prahl y Erhardt, 1985).

2.3 Calcificación

A nivel molecular la formación de arrecifes de coral está determinado por un proceso químico llamado calcificación. El proceso de calcificación se define como la reacción química en donde a partir de Ca²⁺ y CO₂/HCO₃ se genera CaCO₃ + H⁺. Esta reacción es una combinación de los dos procesos de mineralización: 1) biológicamente inducido y 2) mediado por una matriz orgánica. El primero está dado por la maquinaria celular o molecular no especializada para inducir dicha mineralización, y el segundo implica un ambiente y lugar delimitado (Allemand *et al.*, 2011). Uno de los animales que realizan el proceso de calcificación son justamente los corales. Sin embargo, existen otros organismos que también son capaces de realizar el proceso de calcificación.

Por ejemplo, en los cocolitóforos, se ha descrito que al producir cocolitos (derivado de la calcificación), éstos son secretados de un compartimento intracelular, y que por lo mismo requiere grandes flujos iónicos transcelulares para soportar dicho proceso. En particular, la precipitación intracelular de CaCO₃ utilizando CO₂/HCO₃ y Ca²⁺ como sustrato genera cantidades equimolares de H⁺, los cuales deben eliminarse rápidamente para evitar la acidificación citoplasmática (Taylor *et al.*, 2011), es en esta parte del proceso en donde participa el canal de protones Hv1, evitando dicha acidificación y contribuyendo a que se lleve a cabo la calcificación.

A continuación, se describe lo que se conoce hasta el momento de cómo es que ocurre el proceso de calcificación en corales.

2.4 Calcificación en corales

Para hablar de la calcificación en corales primero se tiene que tener en cuenta la existencia de una interface entre el ectodermo calcicoblástico y el esqueleto calcáreo, dicha interface recibe el nombre de Medio extracelular Calcificante (ECM por sus siglas en inglés, Extracellular Calcifying Medium). Dicho medio es importante ya que se ha descrito que tiene comunicación con las células calcicoblásticas que son las encargadas de llevar a cabo la calcificación, esto nos lleva a su vez a la necesidad de una vía de permeación para los iones que participan en el proceso de calcificación (Allemand *et al.*, 2011), sin embargo, aún no se conocen los detalles de cómo es que se lleva a cabo el transporte de iones.

Por otra parte, es preciso señalar el efecto que tiene el pH en el proceso de calcificación. En algunos estudios se midió el pH y la concentración de calcio en el ECM, y lo que observaron fue que se obtienen pH alcalinos al momento en que se empieza a dar la calcificación (Al-horani *et al.*, 2003). Este mismo fenómeno fue observado en el foraminífero *Amphistegina lobifera* (Erez, 2004), lo cual sugiere que existe una estrecha relación entre la calcificación y el pH.

Otro punto a considerar es que existe una gran relación entre el crecimiento del organismo y los niveles de pH, siendo pHs básicos los óptimos para que haya calcificación. Sumado a lo anterior, se ha descrito que los corales de agua fría son los que presentan mayor esta regulación del crecimiento por el pH, seguido de los de aguas templadas y por último los tropicales (*Acropora spp.*) (Raybaud *et al.*, 2017).

El efecto que tiene el pH sobre el crecimiento de los corales también se ha visto reflejado en el crecimiento de los arrecifes de corales. Como sabemos, en los últimos años se han detectado diferentes cambios en el ambiente, principalmente por el aumento en el CO₂ atmosférico producto de la quema de combustible lo que ha ocasionado que haya una acidificación en los océanos repercutiendo a su vez en la calcificación y por ende a la estructura tridimensional del esqueleto calcáreo (Chan *et al.*, 2013), todo esto sugiere que el pH juega un papel fundamental sobre el crecimiento de los corales.

Ahora bien, de acuerdo con lo observado en cocolitóforos (Taylor *et al.*, 2011), foraminíferos (Faber y Preising, 1994; Erez, 2004) y moluscos (Wheeler, 1992) se ha intentado explicar cómo ocurre el transporte de iones en estos organismos durante el proceso de calcificación. Lo anterior ha dado pauta para proponer diferentes modelos que intentan explicar esto mismo aplicado a corales.

Dichos modelos han sido enriquecidos por los resultados de un análisis de transcriptoma completo de pólipos pertenecientes a la especie *Acropora millepora* (Moya *et al.*, 2012). En dicho análisis se pudo apreciar la presencia de diferentes genes que codifican proteínas que pueden participar en la calcificación como canales de Ca⁺, ATPasas de Ca⁺, intercambiador de Na⁺- HCO₃ dependiente de Cl⁻, lo cual permitió postular un modelo que describe el proceso completo (Figura 2), en el cual se propone un canal de Ca²⁺ en la mesoglea como medio de transporte para obtener el calcio necesario para el proceso de calcificación, también se proponen la existencia de dos ATPasas de calcio como los principales transportadores de H⁺, una en el ectodermo calicoblástico y otra en la mesoglea, estas ATPasas presumiblemente tienen el mismo papel que el canal Hv1 encontrado en cocolitóforos, es decir, evitar una acidificación citoplasmática sacando los H⁺ del ECM.

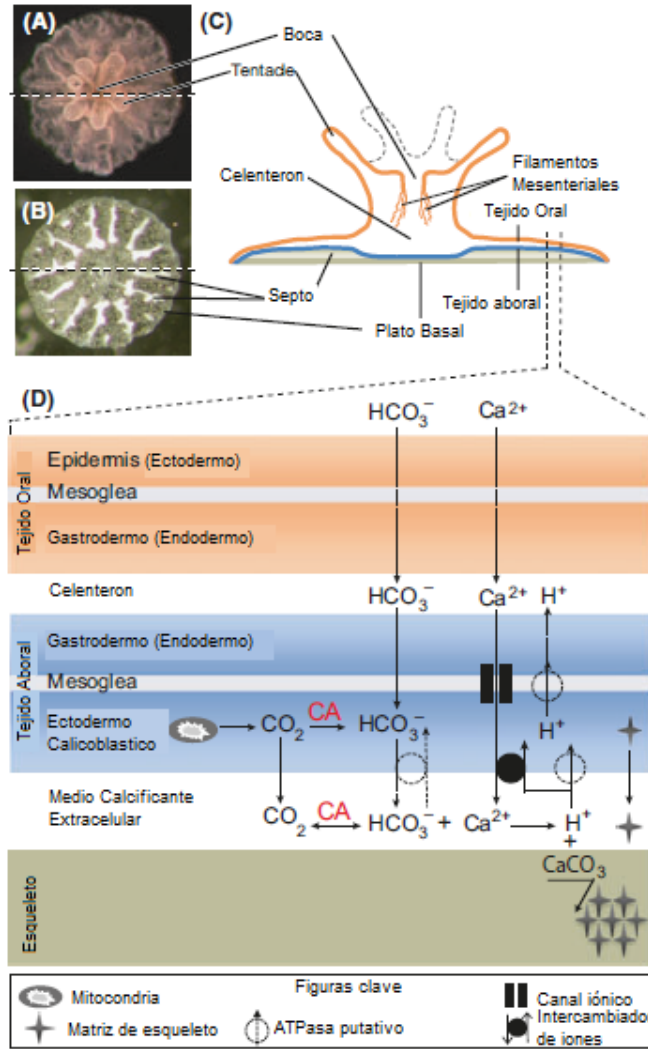


Figura 2. Esquema del proceso de calcificación en el coral *A. millepora*. a) Foto del pólipo desde un punto de vista cenital, b) Esqueleto calcáreo dejado por el pólipo una vez removido éste c) Representación esquemática del pólipo en los primeros estados calcificantes d) Modelo propuesto en el que no solo se utilizaron las proteínas encontradas a partir del trasciptoma completo del pólipo sino que plantea posibles proteínas que ayudan a explicar el principal flujo de iones durante el proceso completo de calcificación en los diferentes tejidos (oral y aboral) (Modificado de Moya et al., 2012).

Un punto que es importante a considerar es que, a pesar de saber el gran papel que juega el pH en la calcificación, hasta el momento no se ha reportado ningún estudio que demuestre la existencia de un transportador o canal de H⁺ que

regule de manera efectiva el pH intracelular en los calicoblastos durante la calcificación.

Respecto a los cocolitóforos es importante mencionar que ya se tiene una idea más clara de cada uno de los elementos que participan en el proceso de calcificación, incluso en esos organismos ya se ha reportado la expresión del canal de protones Hv1, el cual participa en la regulación del pH durante dicho proceso (Taylor *et al.*, 2011).

2.5 Canal Hv1 y la calcificación

Como se mencionó, los cocolitóforos son los únicos organismos que llevan a cabo la calcificación en los que se ha visto implicado el canal Hv1. Como se observa en la Figura 3, en estos organismos existe un compartimento especial derivado del aparato de Golgi, denominado Vesícula Cocolítica en donde se lleva a cabo la calcificación (Makinder *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo reportado para estos organismos, el canal Hv1 participa en la regulación del pH durante el proceso de calcificación. Durante este proceso se producen dos H⁺ por cada molécula de CO₂/HCO₃, los cuales se salen de la Vesícula Cocolítica hacia el citoplasma por gradiente electroquímico, es aquí donde se propone que está participando el canal Hv1 (Figura 3), ya que se necesita expulsar los protones al citoplasma y después al espacio extracelular, para así evitar una acidosis en las células.

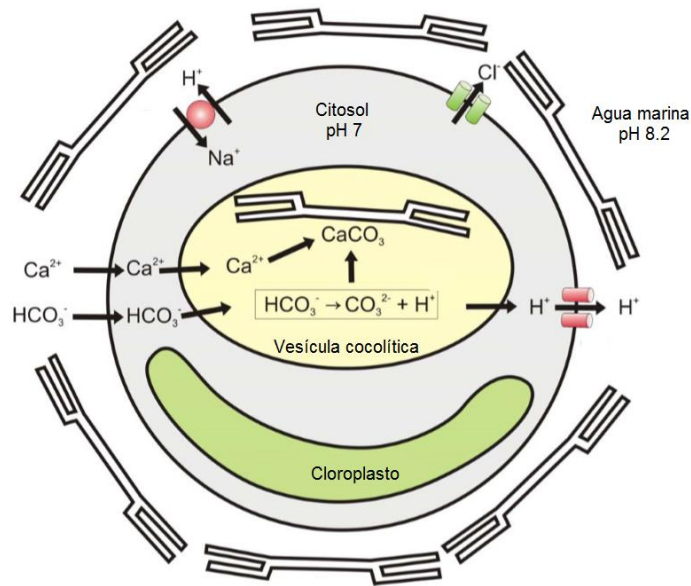


Figura 3. Modelo de los principales flujos de iones que participan durante la calcificación en coccolitóforos. Este modelo representa el papel que juegan los diferentes iones en la regulación de la calcificación, se observa la participación del canal Hv1 para mantener la homeostasis del pH expulsando H^+ del medio citoplasmático al medio extracelular, también está presente un canal de Cloro que ayuda a mantener el potencial de membrana en niveles negativos, actuando como un canal rectificador. (Modificado de Taylor et al., 2011).

2.6 Canales iónicos activados por voltaje

Antes de profundizar sobre el canal Hv1 , se tiene que hablar de la súper familia de canales iónicos activados por voltaje. Esta familia está formada por un gran número de miembros con diferentes características estructurales. Sin embargo, la mayoría presentan un dominio sensor de voltaje (VSD por sus siglas en inglés, Voltage sensor domain).

El VSD es fundamental en este tipo de canales, debido a que contiene de cinco a seis residuos de aminoácidos con carga positiva. Principalmente el cuarto segmento transmembranal contiene aminoácidos como Arginina y Lisina que le permite al canal sensor cambios en el potencial de membrana. Cuando hay un cambio en el potencial de membrana induce un cambio conformacional del canal, lo

que generalmente conllevará en última instancia a la apertura del mismo (Castillo *et al.*, 2015). La presencia de secuencias repetidas de aminoácidos cargados separados entre sí por dos aminoácidos no cargados (cuales sean) a lo largo del cuarto segmento transmembranal como RxxRxxRxxRxxKxxRxx es considerado como un rasgo característico de los canales activados por voltaje.

La arquitectura común de cada subunidad (Ver Figura 4) de este tipo de canales consta de tres partes básicas: el sensor de voltaje, el dominio del poro o vía de conducción y la compuerta de activación (Bezanilla, 2005). El número de subunidades que forma un canal funcional es muy variable en la súper familia de canales activados por voltaje, por ejemplo, algunos de los canales de K^+ están formados por cuatro subunidades, mientras que determinados canales de Ca^{2+} presentan cinco subunidades.

De manera general, cada subunidad presenta seis segmentos transmembranales y un asa del poro. Regularmente la compuerta de activación y el poro están conformados por el asa entre S5 y S6, mientras que el dominio sensor de voltaje está formado por los segmentos S1-S4 (Castillo *et al.*, 2015).



Figura 4. Modelo de un canal iónico activado por voltaje. Se presenta la estructura clásica de un canal activado por voltaje, la cual está dada por las cuatro subunidades (K_v) cada subunidad está constituido por seis segmentos transmembranales (S1-S6), siendo los primeros cuatro los que forman el VSD, mientras que los últimos dos (S5-S6) forman el dominio del poro, lo que da paso a

la compuerta de activación. La subunidad que se muestra del lado derecho corresponde a la quimera Kv1.2/2.1 (PDB: 4JTD) (Modificado de Castillo et al., 2015).

2.7 Canal iónico de protones Hv1

El canal iónico de protones Hv1 (voltage-gated proton channel), es una proteína transmembranal que ha sido identificada en diferentes organismos como humano, ratón, foraminíferos, cocolitóforos, caracol etc., el cual puede detectar cambios en el potencial de membrana celular (DeCoursey, 2018). Es un canal selectivo a protones (H⁺), activado por la despolarización del potencial de la membrana y modulado por la diferencia de pH entre el medio interno y externo de la célula (Zhao *et al.*, 2014). Al igual que los canales de K⁺, Ca⁺ y Na⁺ éste pertenece a la súper familia de canales activados por voltaje.

Hv1 consta de cuatro segmentos transmembranales (S1-S4), y al igual que en los canales canónicos de esta súper familia, estos segmentos (S1-S4) son los que forman el dominio sensor de voltaje. Cada subunidad presenta los grupos N y C terminal ubicados en el espacio intracelular (Wang *et al.*, 2013).

Dicho canal no presenta propiamente un dominio del poro como en el caso de los canales de K⁺, Ca²⁺ y Na⁺ activados por voltaje. Lo que se ha descrito hasta el momento es que el mismo VSD es el que tiene ambos papeles, es decir, sensa el voltaje y permite el paso de protones a través de él (Kurokawa and Okamura 2014). Esto lo hace, debido a que en los segmentos S1-S3 existen residuos de aminoácidos de carácter ácido, los cuales se propone participan en la creación de puentes salinos con los residuos básicos en el VSD, estabilizando la posición de la hélice del segmento S4 (Okamura *et al.*, 2015).

2.8 Posible filtro de protones y mecanismo de transporte

Desde que se logró observar el canal Hv1 en neuronas de caracol (Thomas & Meech, 1982) y subsecuentemente identificar y clonar el canal Hv1 de humano

(Ramsey *et al.*, 2006) se ha intentado describir cómo es que funciona el transporte de protones. Hasta el día de hoy no se sabe a ciencia cierta cómo es que ocurre el movimiento de protones a través del canal. Sin embargo, gracias a diferentes estudios se ha podido proponer un mecanismo que explica cómo puede ocurrir este fenómeno. Hasta el momento, el Mecanismo de Grotthuss es el que mejor logra explicar este fenómeno (Dudev *et al.*, 2015).

El mecanismo de Grotthuss propone la generación de movimientos saltatorios de protones provocando asociaciones entre las moléculas de agua, formando de esta manera moléculas de hidronio (H_3O^+). Las moléculas de H_3O^+ al estar embebidas en el agua van formando enlaces de hidrogeno entre ellas, dando origen al catión Eigen (H_9O_4^+) (DeCoursey, 2013), de esta manera se genera una cadena entre estos cationes que promueve la transferencia de los protones a través de ella (Figura 5).

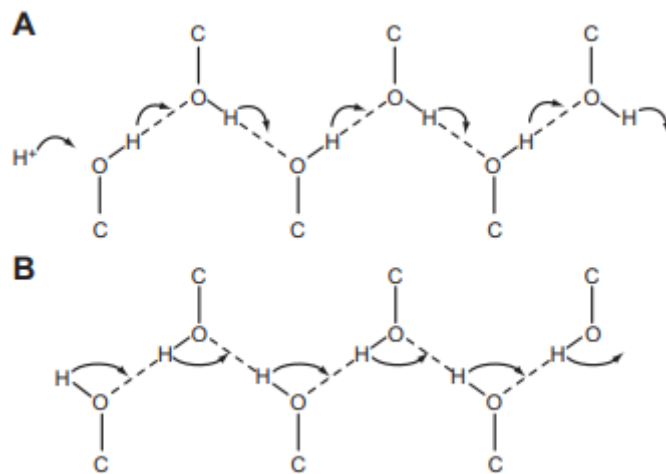


Figura 5. Esquema del mecanismo de cadena de enlaces de hidrógeno. A. corresponde al transporte de H^+ por medio de saltos que ocurren a través de la cadena. B. Es la cadena después del transporte de H^+ , la cadena no puede aceptar otro protón hasta que todos los grupos de la cadena se reorienten. (DeCoursey, 2013).

De acuerdo con resultados experimentales se ha determinado que el aminoácido que participa en el filtro de selectividad es el ácido aspártico en la posición 112 (en el caso del canal Hv1 de humano), ya que, si es sustituido por un

residuo de aminoácido neutro como una asparagina o serina, genera que el canal sea selectivo a aniones (DeCoursey *et al.*, 2016).

A través de modelos computacionales se propuso la interacción entre el ácido aspártico 112 y la arginina 208 del segmento S1 y S4 respectivamente, formando puentes salinos entre ellos (Figura 6), dichos puentes son fácilmente rotos por la interacción de los H_3O^+ , propiciando la realización de la cadena en el mecanismo de Grotthuss (Dudev *et al.*, 2015).

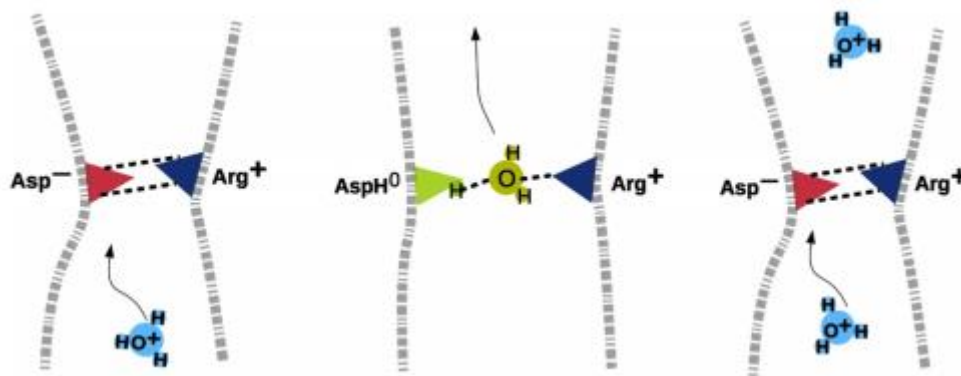


Figura 6. Esquema del filtro de selectividad en *Hv1*. Representación de la interacción que se da entre los segmentos S4 y S1 por medio de los residuos de aminoácidos Ácido aspártico (Asp) y Arginina (Arg) respectivamente. En líneas punteadas se muestra el puente salino que forman el Asp y la Arg, (lado izquierdo) el cual es brevemente interrumpido por el hidronio, protonando el filtro de selectividad y formando enlaces de hidrógeno con el Asp (parte central), dejando que la molécula de agua funja como un puente entre los dos residuos de aminoácidos, una vez pasa el hidronio se vuelve a formar el puente salino (lado derecho). (Dudev *et al.*, 2015).

2.9 Modulación por el pH

Es importante mencionar que el canal *Hv1* es regulado por el ΔpH ($pH_e - pH_i$), es decir, que su activación se ve afectada por la diferencia entre el pH intracelular (pH_i) y extracelular (pH_e), abriéndose fácilmente al disminuir el pH intracelular o aumentar el pH extracelular. En un contexto biológico la tendencia es a aumentar el ácido intracelular, lo que conlleva a que el canal se abra cuando existe un gradiente

electroquímico de salida, expulsando de esta manera el ácido intracelular (DeCoursey, & Cherny, 1995).

Una característica que se aprecia al cambiar las concentraciones de pH es la respuesta que tiene el voltaje de activación media ($V_{1/2}$) a estos cambios (Figura 7), siendo que a ΔpH positivos la dependencia al voltaje cambia aproximadamente -40 mV por unidad de ΔpH , mientras que a valores negativos de ΔpH la dependencia cambia +40 mV por unidad de ΔpH (DeCoursey, 2018).

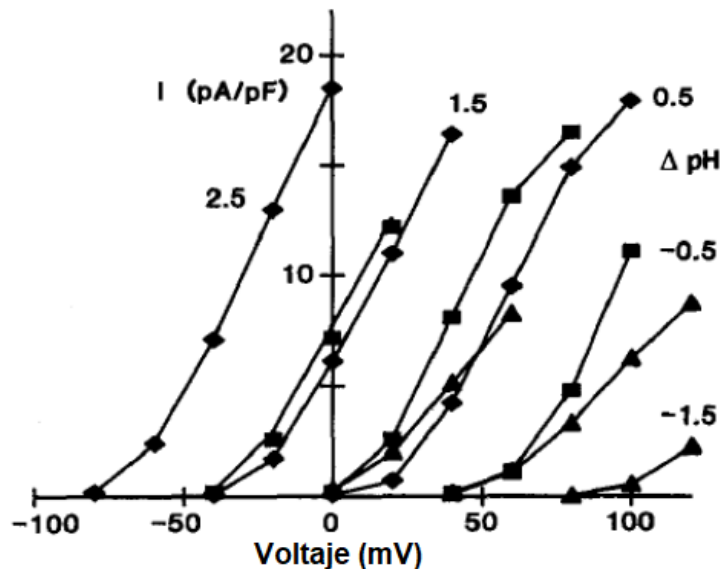


Figura 7. Gráficas Corriente vs Voltaje (I/V) a diferentes deltas pH del canal $Hv1$ de rata. Se observa la relación entre nueve valores de ΔpH (de 2.5 a -1.5) y la activación del canal $Hv1$ en células epiteliales alveolares de tipo II de rata, cambiando su relación aproximadamente +40 mV por unidad negativa de ΔpH y -40 mV por unidad positiva de ΔpH (Modificado de DeCoursey & Cherny, 1995).

La modulación dada por el ΔpH se ha sugerido que se debe a las interacciones electrostáticas que se dan entre las argininas en S4 y los residuos de aminoácidos de carácter ácido presentes en los demás segmentos transmembranales (Figura 8), las cuales estabilizan el estado cerrado o abierto del canal. Estas interacciones pueden ser inhibidas por la protonación de los residuos ácidos, de esta manera cuando estas interacciones están en contacto con la solución interna en el estado cerrado ocasiona que se desestabilicen promoviendo

el estado abierto del canal, de la misma manera la protonación de los residuos que están accesibles en la parte externa cuando el canal está en estado abierto, ocasiona la eliminación de las interacciones con las argininas, dado como resultado el estado cerrado del mismo (DeCoursey, 2018).

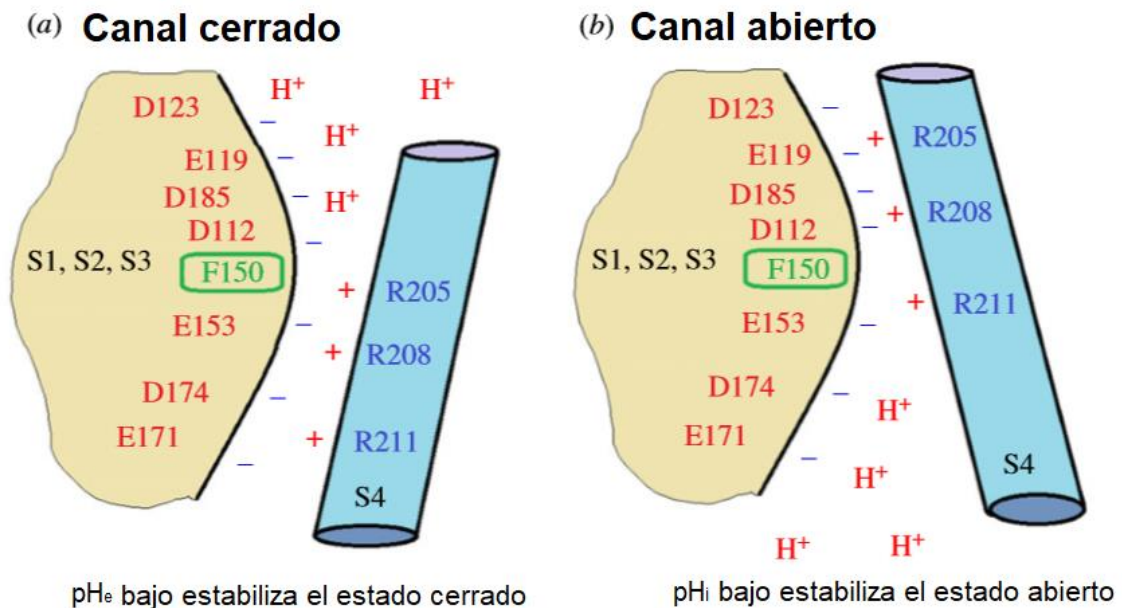


Figura 8. Modelo de la participación del pH en la regulación del canal Hv1. Esquema en donde se ven representados los 4 segmentos transmembranales (S1-S4), así como los residuos de aminoácidos de carácter ácido en rojo presentes en los segmentos S1-S3 que interactúan con los residuos de carácter básico en el segmento S4 representados de color azul. A corresponde al estado cerrado del canal debido a las interacciones electrostáticas entre los 4 segmentos. B es el estado abierto del canal resultado de la protonación de las interacciones en A (Modificado de DeCoursey, 2018).

2.10 Dimerización del canal Hv1

De acuerdo con los resultados obtenidos en diferentes estudios, se ha propuesto que este canal está formado por dos subunidades. La región que se ha sugerido está involucrada en el ensamble del canal es el Carboxilo terminal (C-terminal) (Figura 9).

Los dominios C-terminal de cada subunidad forman una estructura denominada Coiled-coil (rollo enrollado) (DeCoursey, 2018), dicha estructura está dada por unidades presentes en las hélices que la conforman, en las cuales se repite generalmente siete aminoácidos hidrofóbicos denominados (*a-g*), en donde las posiciones *a*, *d*, *e* y *g* pueden regular la estructura y la estabilidad del Coiled-coil, siendo las posiciones *e* y *g* las que participan con sus cargas electrostáticas, mientras las posiciones *a* y *d* son las que forman el ensamblaje en la dimerización (Boonamnaj *et al.*, 2018).

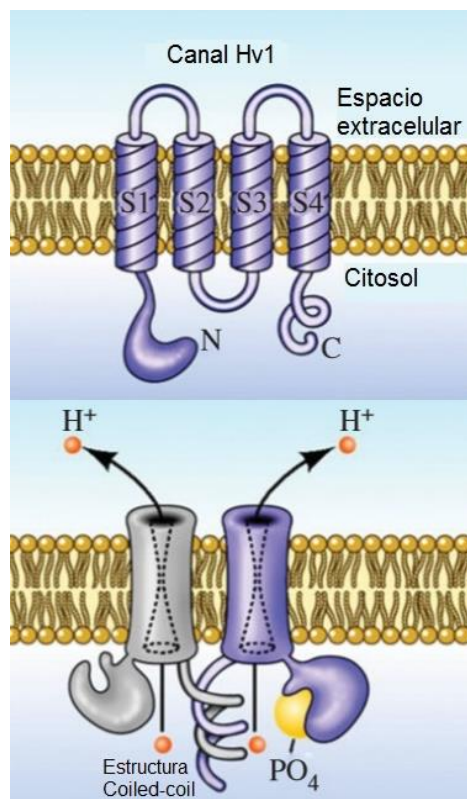


Figura 9. Esquema de la estructura del canal Hv1. En la parte superior se encuentra el esquema de un monómero de Hv1, en donde se aprecian los cuatro segmentos transmembranales (S1-S4), además del C terminal y el N terminal que están en la parte intracelular. En la parte inferior se observa el esquema de Hv1 como dímero, en donde se aprecia la estructura Coiled-coil que está dada por los C terminales de cada uno de los monómeros. (Modificada de DeCoursey, 2018).

En estudios en los cuales se ha analizado la función de canales a los cuales se les eliminó el carboxilo terminal se observó que la cinética de activación cambia

con respecto al canal completo (Figura 10). En el canal sin C-terminal se observa un comportamiento exponencial, mientras que para el canal completo se observó un comportamiento sigmoideo (DeCoursey, 2018).

Dichos resultados sugieren que existe un “*gating*” o mecanismo de apertura cooperativa, es decir, que cada subunidad presenta actividad independiente por lo cual al ser un dímero, ambas subunidades tienen que estar en un estado conductivo, misma razón que ocasiona que la activación del canal completo sea aproximadamente 5.5 veces más lenta que el canal sin C-terminal (Musset *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014).

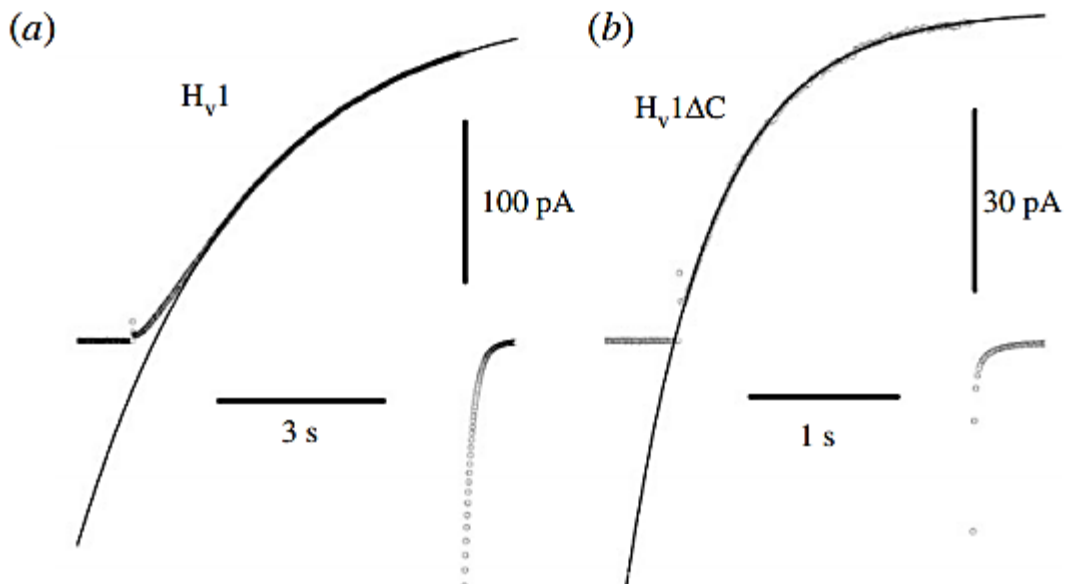


Figura 10. Cinética de activación del canal *Hv1* de ratón en células HEK293. Se muestran dos curvas G-V del canal *Hv1* completo y sin el C-terminal. Presentando en (a) un comportamiento sigmoideo y en (b) un comportamiento exponencial, las líneas negras presentadas corresponden al ajuste de una sola exponencial (DeCoursey, 2018)

2.11 *Acropora millepora*

En el presente estudio nos interesó saber si en especies de coral se expresa alguna proteína especializada en regular la concentración de protones durante la

calcificación. Como ya se ha descrito, una de las proteínas candidatas que pudiera ser importante en la regulación del pH es el canal Hv1. Dado que pudimos identificar a nivel de transcriptoma algunas secuencias que parecían codificar al canal Hv1 en *Acropora millepora*, decidimos utilizar a esta especie como modelo de estudio.

Acropora millepora es un animal que pertenece al Filo Cnidaria, de la clase Anthozoa, cuyo orden es Scleractinia y su familia es Acroporidae. Este organismo se distribuye en aguas tropicales del océano Indo-Pacífico, desde las costas de África hasta las islas Fiyi en el Pacífico (Brusca et al., 2003). En cuanto su morfología, las colonias de esta especie son típicamente ramificadas, sus pólipos son muy pequeños y presentan células urticantes denominadas nematocistos empleadas en la caza de presas microscópicas de plancton (Anthony, 1999). *A. millepora* suele vivir en zonas iluminadas y poco profundas, en un rango no mayor a los 12 metros, entre 25.48 °C y 28.61 °C (Richards et al., 2015).

A. millepora es un coral hermatípico, y forma parte de la base de los arrecifes coralinos los cuales son constituidos además de corales de este tipo por animales coloniales o solitarios que se caracterizan por tener la capacidad de secretar un exoesqueleto calcáreo, adoptando diferentes formas según la especie, su ubicación en el sustrato y la presión del ambiente (Perilla et al., 2007).

3. Justificación

La calcificación es un proceso de mineralización regulado por una matriz orgánica (compartimento celular especializado) y por un suministro de iones cuyos productos finales son CaCO_3 y H^+ . En cocolitóforos se tienen evidencias que el canal Hv1 participa en el proceso de calificación. En estos organismos se demostró que dicho canal se expresa en la membrana celular y previene la acidosis citoplasmática expulsando protones. Dado que los corales llevan a cabo el proceso de calcificación y ésta se regula por la concentración de pH, es probable que al igual que en los cocolitóforos, los corales también expresen el canal Hv1, los cuales participarían en el control de pH en las células calcoblásticas evitando la acidosis citoplasmática.

De acuerdo con estos antecedentes planteamos la siguiente hipótesis:

4. Hipótesis

Los corales al ser organismos calcificantes iguales a los cocolitóforos expresan el canal Hv1. Dicho canal tendrá propiedades funcionales similares a las ya descritas para esta proteína, incluyendo su estequiometría.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Establecer la existencia del putativo canal de protones Hv1 expresado en *Acropora millepora* y realizar la clonación y caracterización de la estequiometría del mismo.

5.2 Objetivos particulares

- Extraer ARN total del coral *Acropora millepora*.
- Diseñar oligonucleótidos con base en los diferentes alineamientos de secuencias reportadas de Hv1 y amplificar por RT-PCR la secuencia correspondiente.
- Clonar la secuencia de Hv1 putativo en el vector pcDNA3.1
- Obtener las construcciones del canal Hv1 de *A. millepora* fusionado con las proteínas Cerulean y Citrine, tanto para el canal completo como para el canal que tiene eliminado el dominio C-terminal.
- Verificar por medio de la técnica *Patch clamp* la funcionalidad de las construcciones
- Realizar un análisis mediante la técnica de FRET para determinar si el canal Hv1 del coral *A. millepora* se expresa como un dímero o como monómero.

6. Material y método

6.1 Identificación de la posible secuencia del canal Hv1 putativo de *Acropora millepora* y diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo la clonación del canal Hv1 de *A. millepora* se buscaron secuencias en el GenBank que codificaran para el canal Hv1 en diferentes especies de corales. Se obtuvieron cuatro secuencias de nucleótidos resultado de la búsqueda. Los números de acceso correspondientes son: XM_015907823.1, XM_015907824.1, XM_029346499.1 y XM_029346498.1, perteneciendo las primeras dos a *Acropora digitifera* y las dos subsecuentes a *Acropora millepora*. Todas las secuencias se reportaron como Hv1 like y como parte de análisis de transcriptoma de las dos especies.

Con el propósito de identificar regiones conservadas entre las secuencias encontradas se efectuaron diversos alineamientos utilizando el servidor CLUSTALW. De igual manera se llevó a cabo un análisis de estructura secundaria, para lo cual se generaron modelos *in silico* de cada fragmento, utilizando el servidor SWISS-MODEL. Por su resolución (3.46 Å) y debido a que es el modelo más completo que se tiene del canal Hv1 se empleó como molde el PDB: 3WKV, el cual corresponde a la quimera del canal Hv1 de ratón con el VSD del urocordado *Ciona intestinalis* (mHv1cc). Los modelos obtenidos se analizaron en el programa Pymol.

Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos que permitan clonar de manera parcial y total el putativo canal Hv1 de coral (ver Tabla1)

Tabla 1. Diseño de oligonucleótidos. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la clonación de las regiones Amino y Carboxilo así como el putativo canal completo Hv1 de *A. millepora*.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
<i>AcHv1Ct5</i>	ATGGGATTACATTTTTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTT
<i>AcHv1Ct3</i>	TCAGCTTTGTTTTAATGTTGTCAATTCAGACTCCAAGT
<i>AcHv1Nt5</i>	ATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATGAT
<i>AcHv1Nt3</i>	TGATCCTGCTCTCAAGTCAAGAACCAACTCAGCAATGAC

6.2 Extracción de ARNtotal de *Acropora millepora*

Como punto de partida se empleó el fragmento de un coral propagado de manera *in vitro* proveniente de un acuario local, el cual fue identificado como *Acropora millepora* por el Doctor León Islas.

Se utilizó el método de Chomczynski y Sacchi (1987) para la extracción de ARNtotal incubando por dos minutos una muestra de coral de aproximadamente 3 cm en 5 ml de Solución D (Tiocianato de guanidina 4 M, Citrato de sodio 25 mM, Sarcocyl 5% y 2-Mecarptoetanol 0.1 M). Posterior a la incubación se despegaron los pólipos del esqueleto calcáreo con una pipeta, subiendo y bajando suavemente la solución D por dos minutos. Después se retiró el esqueleto calcáreo y se continuó con la extracción de ARNtotal de acuerdo con el protocolo antes citado.

6.3 Amplificación del putativo canal Hv1 por RT-PCR

Para realizar las amplificaciones se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Reaction Chain, por sus siglas en inglés), la cual consiste en generar múltiples copias de ADN a partir de un fragmento del mismo, esto lo hace a través de tres fases: Desnaturalización, Alineamiento y Elongación, las cuales se repiten en 20 a 25 ciclos.

En la Desnaturalización se calienta la muestra de ADN aproximadamente a 96-98°C para separar las hebras de ADN y de esta manera el oligonucleótido diseñado pueda unirse a la muestra. El Alineamiento consiste en la unión del oligonucleótido a la muestra desnaturalizada de ADN, para ello se baja la temperatura aproximadamente a 40-68°C por 20-40 segundos dando pauta así a la unión entre ambos. Por último está la Elongación, en la cual actúa la ADN polimerasa partiendo del oligonucleótido para la síntesis del ADN nuevo, en esta última fase la temperatura depende meramente de las características de la polimerasa que se empleó, aunque comúnmente la temperatura que se utiliza en esta fase es 72°C (Alberts *et al.*, 2015).

Para obtener el ADN de *A. millepora* necesario para las amplificaciones por PCR se hizo una retrotranscripción partir de 1 µg de ARN total utilizando Oligonucleótido dT y la enzima SuperScriptII (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. A continuación, se realizaron tres mezclas independientes de PCR para intentar amplificar los segmentos que se propone corresponden a las regiones Amino y Carboxilo terminal de la proteína, al igual que el teórico canal Hv1 completo del coral *A. millepora*.

Para llevar a cabo las PCRs independientes se utilizaron los oligonucleótidos: 1) AcHv1Nter5´ y 3´; 2) AcHv1Cter5´ y 3´ y 3) AcHv1Nter5´ y AcHv1Cter3´. En todas las reacciones se utilizaron dos ADN polimerasa; La primera enzima fue la Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) debido a su alta fidelidad, siguiendo las especificaciones del proveedor. La segunda enzima que se utilizó una vez concluida la PCR fue la Taq DNA polymerase manteniendo la reacción por 10 minutos a 72°C para que la muestra no se desnaturalice y que se agreguen de esta manera Adeninas únicamente en los extremos 5´ y 3´ y así poder clonar fácilmente los fragmentos amplificados en el vector pGEM-T, ya que este vector es lineal y presenta una serie de Timinas.

Una vez que se clonó el canal completo AmHv1 en el vector antes mencionado, se procedió al diseño de nuevos oligonucleótidos AcHv1Nter 5´ y AcHv1Cter 3´ con sitios de restricción de las enzimas KpnI y NotI respectivamente para lograr subclonar el canal en el vector pcDNA3.1 el cual tiene el promotor CMV, necesario para su expresión en células HEK293, en donde se realizaron los experimentos electrofisiológicos y de fluorescencia. Cada una de las construcciones fue verificada por secuenciación automática.

6.4 Obtención de las fusiones AmHv1 y AmHv1 Δ C con las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine

Una vez clonado el canal AmHv1, se construyeron cuatro fusiones del canal AmHv1 (WT) y AmHv1 sin el C-terminal (Δ C) con las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine. Dichas construcciones fueron utilizadas para realizar el estudio sobre la estequiometría del canal mediante la técnica de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés). Las construcciones quedaron de la siguiente manera:

- Citrine-GGGG-AmHv1-pcDNA3.1
- Cerulean-GGGG-AmHv1- pcDNA3.1
- Citrine-GGGG-AmHv1 Δ C -pcDNA3.1
- Cerulean-GGGG-AmHv1 Δ C-pcDNA3.1

Para determinar a partir de qué residuo de aminoácido comenzaba el C-terminal e inicia la estructura conocida como Coiled-coil se tomó como referencia el aminoácido K221 del canal hHv1 (Qiu *et al.*, 2013) que es donde se conoce empieza este dominio en el canal de humano. El aminoácido correspondiente en AmHv1 es Q185. Una vez determinado esto, se utilizó la técnica PCR *overlap* para construir las fusiones previamente descritas (ver Figura 11).

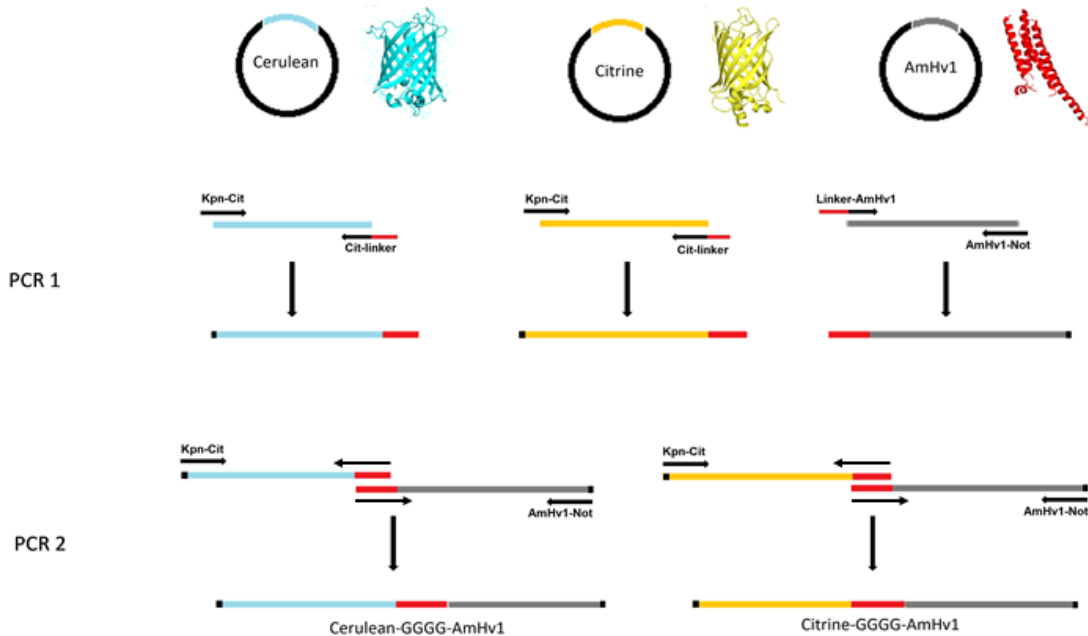


Figura 11. PCR overlap. Esquema en donde se ve representada la técnica PCR overlap, la cual está constituida por dos PCRs, siendo la primera utilizada con la finalidad de obtener el ADN de cada una de las secuencias de interés y además agregar a las mismas una secuencia linker, la cual contiene cuatro Glicinas. La segunda PCR es usada para fusionar ambas secuencias amplificadas en la PCR 1. Esta misma estrategia se utilizó para obtener las construcciones con AmHv1 Δ C.

Para las PCRs 1 y 2 se utilizaron los oligonucleótidos que se encuentran en la Tabla 2 y como moldes se emplearon: la construcción AmHv1-pcDNA3.1, para amplificar el canal tanto completo como trunco, y para amplificar las secuencias de las proteínas fluorescentes se utilizaron plásmidos que contenían las secuencias de las proteínas fluorescentes.

Una vez que se obtuvieron los fragmentos amplificadas en la PCR1 se realizó la segunda PCR. Para esta reacción se utilizaron como moldes los fragmentos amplificadas en la PCR1 y como oligonucleótidos KpnI-Cit y AcHv1-NotI (o Δ C-NotI). Los oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' de la fusión contienen los sitios KpnI y NotI respectivamente, estos sitios se utilizaron para clonar la fusión en pcDNA3.1.

Para todos los casos se utilizó la enzima Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) utilizando el protocolo recomendado por el proveedor. Obtenidas las construcciones, todas fueron verificadas por secuenciación automática.

Tabla 2. Oligonucleótidos para PCR overlap. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en las dos PCRs que conforman la técnica PCR overlap.

<i>Nombre del oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
<i>KpnI-Cit-dir</i>	TATACAAAAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
<i>Citrine-Link com</i>	CCCGCCTCCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
<i>Link-Hv1 dir</i>	GGTGGAGGCGGGATGGCCACCTGGGACGAAAAG
<i>AcHv1 Q185Stop-Not 3'</i>	TGAAC TTT CGCCTGCGGCCGCTCATTGCACGGACAAAATAATTCCGTT
<i>AcHv1 NotI 3'</i>	CCATGAACTTTTCGCCTGCGGCCGCTTCTCAGCTTTGCTTTAATGTTGTCAA

6.5 Expresión de las cuatro construcciones en células HEK293

Como modelo de expresión heteróloga se utilizaron las células HEK293 (Human Embryonic Kidney, por sus siglas en inglés) debido a que presentan pocas corrientes iónicas endógenas lo que permite controlar las condiciones experimentales.

Las células HEK293 se incubaron en una caja Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%, a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Las células se dejaron crecer 72 horas para posteriormente ser resembradas en cajas Petri de 35 mm x 10 mm con 2 ml de medio, estas cajas tenían de 6 a 10 vidrios esterilizados para los experimentos electrofisiológicos, en el caso de los experimentos de fluorescencia se utilizaron cajas Petri del mismo tamaño pero con fondo de vidrio, marca WPI.

Transcurridas 24 horas después del resembrado de células, se realizaron transfecciones y co-transfecciones transitorias de las cuatro construcciones Cerulean-GGGG-AmHv1, Citrine-GGGG-AmHv1, Cerulean-GGGG-AmHv1 Δ C y Citrine-GGGG-AmHv1 Δ C, denominadas a partir de este momento como Cerulean WT, Citrine WT, Cerulean Δ C y Citrine Δ C respectivamente.

Para las transfecciones individuales de las construcciones se hicieron dos mezclas en tubos Eppendorf de 1.5 ml por separado, en el primer tubo se colocaron 100 μ l de NaCl y 50 ng-100 ng de ADN total; en el segundo tubo se pusieron 4 μ l de jetPEI (PolyPlus) como agente transfectante y 100 μ l de NaCl, esta última mezcla se vertió en el primer tubo y se homogeneizaron las mezclas. Esta nueva mezcla se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente y después fue agregada a las cajas pequeñas con células para el registro electrofisiológico o para FRET.

En el caso de las co-transfecciones se siguió el mismo protocolo que las transfecciones individuales variando únicamente las proporciones que fueron de 1:1 hasta 5:1, dependiendo de la combinación a estudiar.

6.6 Electrofisiología

La medición de la corriente que pasa a través de los canales iónicos se hizo mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*. Esta técnica consiste en formar sellos de alta resistencia ($G\Omega$) con una pipeta de borosilicato en una pequeña parte de la membrana celular.

De manera general el *Patch clamp* utiliza un amplificador operacional que compara la entrada del potencial de la pipeta con un potencial de referencia, la salida de este amplificador está conectada a una resistencia de retroalimentación, es debido a esto que es considerado un sistema de retroalimentación positiva (Kornreich, 2007)

Para evitar alteraciones en el potencial de membrana, el amplificador genera una corriente de compensación que se asemeja a la corriente que fluye a través de la membrana. El potencial de membrana de la célula se mide y se compara con el potencial de referencia. Si hay diferencias entre el potencial de referencia y la medida, se inyectará una corriente. Esta corriente de compensación se registrará y permitirá sacar conclusiones sobre la conductancia de la membrana (Veitinger *et al.*, 2011)

Existen diferentes configuraciones de la técnica *Patch clamp* (ver Figura 12), cada una ellas tienen como base la configuración célula adherida o *cell attached*, la cual consiste en la formación del sello en la célula, permitiendo de esta manera conservar el ambiente natural del medio interno de la célula (Veitinger *et al.*, 2011).

Al succionar levemente la pipeta inmediatamente después de tener el *cell attached*, se obtiene la siguiente configuración llamada *inside-out*, exponiendo la parte intracelular de la membrana al medio externo o baño con solución de registro. Si en vez de succionar levemente se hace con un poco más de fuerza y se logra romper el fragmento de membrana que se encuentra dentro de la pipeta sin perder el sello se obtiene la configuración *whole-cell*, misma que permite el acceso al citoplasma para que de esta manera se puedan registrar todos los canales presentes en la célula (Kornreich, 2007).

Por último, se encuentra la configuración *outside-out* que se obtiene a partir del *whole-cell*, levantando la pipeta y dejando que los trozos de la membrana se vuelvan a unir por las propiedades fosfolipídicas, dando acceso al dominio extracelular (Veitinger *et al.*, 2011).

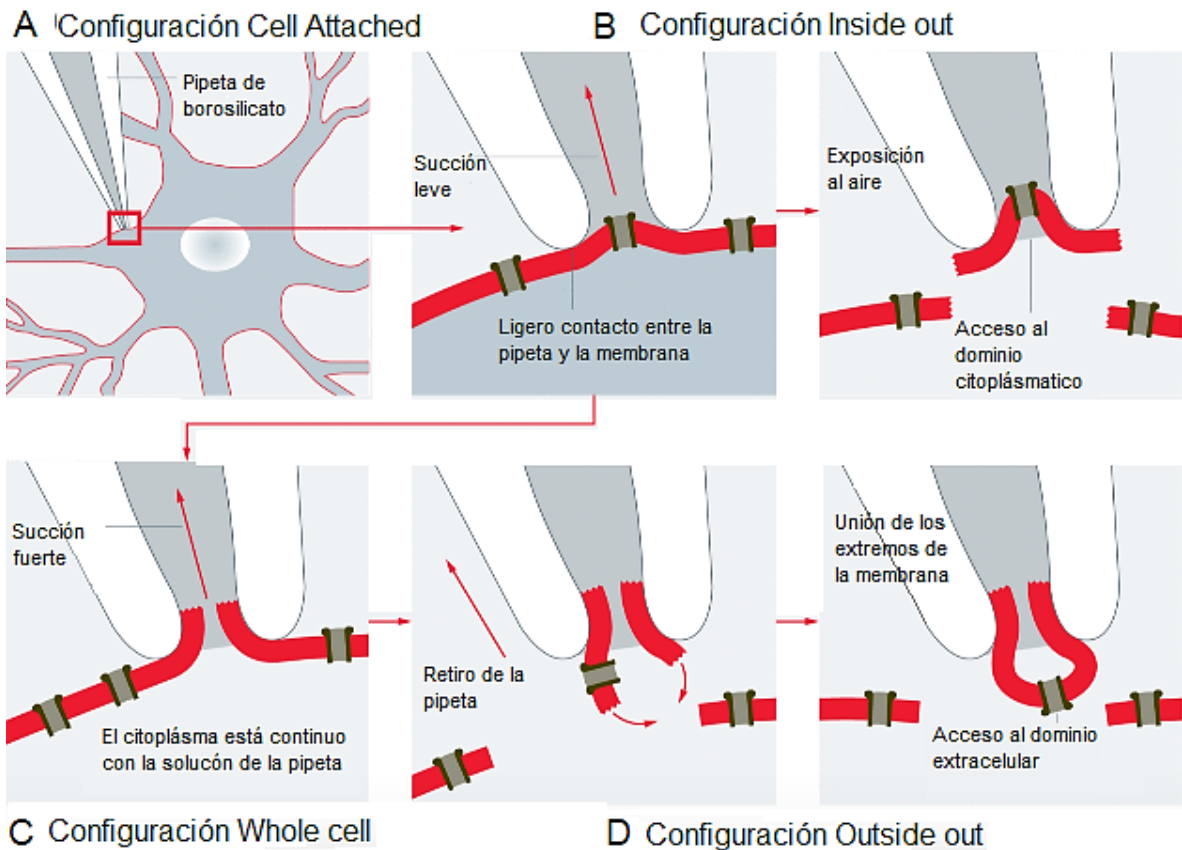


Figura 12. Configuraciones de la técnica *Patch clamp*. Esquema que muestra las cuatro configuraciones de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*. A) corresponde a la formación del sello entre la pipeta de registro y la célula a registrar dando la configuración *Cell attached*. B) Es la representación de la pequeña succión que se necesita hacer para obtener la configuración *inside out*. C) Es la configuración *whole-cell* que se tiene después de ejercer una succión fuerte una vez conseguido el *Cell attached*. D) muestra cómo se reincorporan los fragmentos de la membrana por sus propiedades fosfolipídicas retirando la pipeta de registro una vez alcanzo el *Whole-cell*. (Modificado de Veitinger, 2011).

6.7 Obtención de datos electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos se realizaron en una configuración *inside out* de la técnica *Patch clamp*. Se utilizaron pipetas de borosilicato (Sutter), mismas que fueron pulidas con una microforja MF-830 (Narishige) dando como resultado una resistencia entre 3-6 M Ω en las pipetas. Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente (~25°C) utilizando un amplificador EPC (HEKA Electronic) y el programa

Pulse y Patch Master (HEKA Electronic GMBH). Las corrientes obtenidas fueron analizadas con el programa Igor Pro (Wavemetrics Inc).

Los experimentos se realizaron con un ΔpH de 0.5 (6.5 extracelular y 6 intracelular), y con un protocolo de registro que va de -40 a 120 mV con pulsos de incremento de 20 mV y un potencial de mantenimiento de -60 mV. Se utilizó la misma solución tanto para la pipeta como para el baño, en la Tabla 3 se muestran los reactivos y concentraciones de la solución utilizada.

Tabla 3. Solución empleada en los registros electrofisiológicos.

Reactivo	Concentración (mM)
TMAOH	80
HMESO₃	80
HEPES	100
HCl	8
CaCl₂	2
MgCl₂	2

6.8 Microscopia confocal

Para conocer la distribución del canal AmHv1 en las células HEK293, se tomaron imágenes con un microscopio confocal invertido Leica TCS SPS de las cuatro construcciones, transfectadas por separado así como co-transfectadas en las combinaciones Cerulean-WT:Citrine-WT y Cerulean- ΔC :Citrine- ΔC en una proporción 1:1.

Las imágenes se obtuvieron excitando la muestra a 458 nm y 488 nm con un láser de Argón. Así mismo se obtuvieron imágenes en campo claro. Las imágenes

de confocal fueron adquiridas a 63X y se obtuvieron cortes de 1 μm de grosor en el eje Z; Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa LAS X (Leica).

6.9 FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, es un fenómeno físico en el que la energía absorbida por una molécula fluorescente denominada donadora es transferida a otra molécula (que puede o no ser una proteína fluorescente) conocida como aceptora a través de un proceso no radiativo. Cabe mencionar que esta transferencia es dada por las interacciones dipolo-dipolo entre ambas moléculas (Takanishi *et al.*, 2006).

Para que este fenómeno ocurra se necesitan cumplir tres condiciones (Ver Figura 13), 1) Que el espectro de emisión del donador se superponga con el espectro de excitación del aceptor. 2) La orientación relativa entre el dipolo de emisión del donador y el dipolo de absorción del aceptor no se encuentre de manera perpendicular, ya que al ser más perpendicular sus orientaciones, las oscilaciones de la resonancia entre éstas se cancelan y por ende hay menos transferencia energética. 3) La distancia entre el donador y aceptor debe ser no mayor de 10 nm (Vogel *et al.*, 2006) (este número puede variar dependiendo del donador-aceptor que se utilice). Esta última condición es de suma importancia ya que es gracias a ella que podemos utilizar este fenómeno como regla molecular debido a que está involucrada la distancia en el mismo.

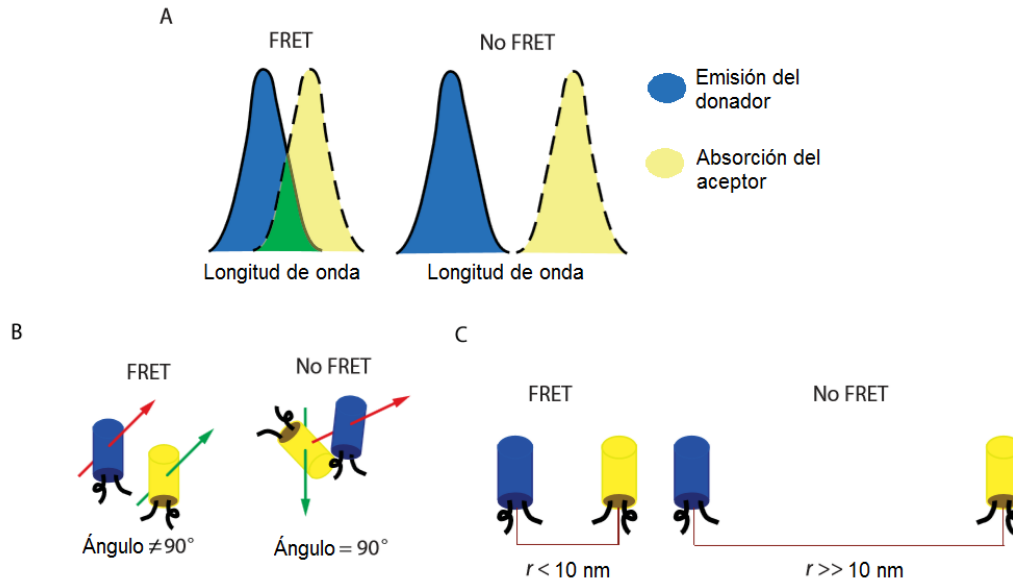


Figura 13. Condiciones FRET. Se muestran las tres principales condiciones para tener FRET. *A* Es el solapamiento de los espectros de emisión y excitación del donador-aceptor. *B* La orientación de los dipolos del par FRET. *C* Es la distancia mínima sugerida requerida. (Modificada de Vogel et al., 2006)

La teoría de la transferencia de energía muestra que la eficiencia de FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre dos moléculas (Lakowicz, 2006):

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Donde r es la distancia que hay entre el donador y aceptor, R_0 es la distancia en donde la eficiencia de FRET es del 50%, el valor de éste último deriva de las propiedades espectroscópicas de cada par FRET (donador-aceptor) así como de las características entre ellas y del medio en donde se localicen, por lo cual R_0 se puede calcular para cualquier par FRET por medio de la siguiente ecuación:

$$R_0 = 0.211(k^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{\frac{1}{6}}$$

Donde k^2 es el factor de orientación entre los dipolos del donador y aceptor, n es el índice refractario del medio, Q_D es el rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor y $J(\lambda)$ es la integral del solapamiento del espectro de emisión del donador y el espectro de excitación del aceptor, y está dada por:

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

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

El factor k^2 está definido por la posición angular del aceptor con respecto al vector del dipolo de emisión del donador θ y, la orientación del dipolo de absorción del aceptor con relación al campo eléctrico del donador (Van der Meer, 2002). Por lo cual el factor k^2 está dado por:

$$k^2 = (1 + 3 \cos \theta) \cos \omega$$

Un factor importante que se debe de considerar es que la orientación de las moléculas donadoras yceptoras se da de manera azarosa por lo cual se desconocen los valores reales de θ y ω y por lo tanto también de k^2 . Utilizando la probabilidad se ha establecido que el valor de k^2 es $2/3$, debido a que el valor promedio de un ángulo polar es de $1/3$ y dado que θ y ω son independientes da como resultado el valor antes descrito para k^2 (Vogel *et al.*, 2006).

6.10 Adquisición de datos FRET

Para determinar la eficiencia aparente de FRET (E_{app}), se tiene que medir los espectros de emisión del donador (Cerulean) y del aceptor (Citrine) por

separado, por lo cual se realizaron transfecciones transitorias con 50 ng totales de ADN de las construcciones Cerulean WT y Citrine WT en células HEK293.

De 24 a 48 horas después de la transfección, se realizaron las mediciones de los espectros de emisión correspondientes a cada una de las proteínas fluorescentes. Las células fueron analizadas en un microscopio invertido de epifluorescencia TE-2000U (Nikon), el cual está acoplado a un láser Ar-Ion 163C (Spectra-Physics) de tres líneas: 458, 488 y 514 nm, ocupando las líneas 458 nm y 488 nm para excitar a Cerulean y Citrine respectivamente. Para ello se utilizó un espectrógrafo de gradilla Spectra Pro 2150i (Action Instruments) acoplado a la cámara EMCCD modelo DL-658M-TIL (Luca, Andor) (Ver Figura 14).

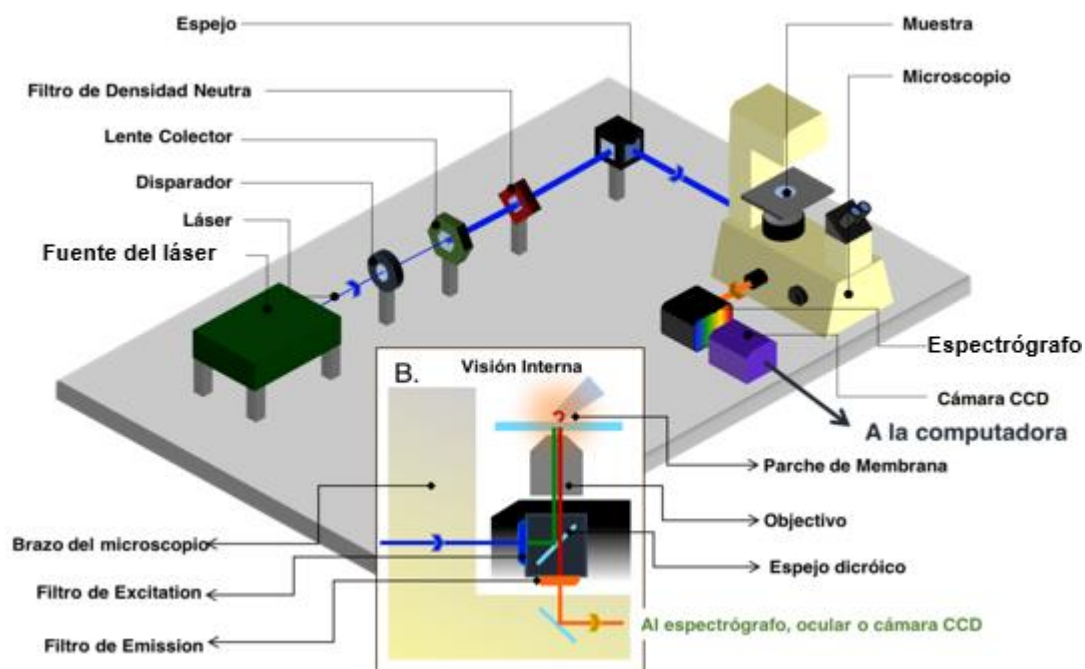


Figura 14. Esquema del equipo utilizado. Esquema en donde se observan los diferentes componentes y equipos que se ocuparon para la adquisición de datos en los experimentos, así como su distribución, empezando por el láser de tres líneas (458, 488 y 514 nm) el cual pasa por un filtro de densidad neutra, seguido de un espejo que redirecciona el láser hacia el microscopio, excitando de esta manera la muestra de interés, la señal emitida por la muestra es captada por un

espectrógrafo el cual está acoplado a una cámara, finalmente la señal capturada por la cámara es enviada a una computadora para su posterior análisis. (Modificado de Suárez-Delgado & Islas, 2020).

Debido a que, en parte, Citrine también se excita a 458 nm, se tiene que determinar cuál es el porcentaje de fluorescencia dada a esa longitud de onda, para lo cual se realiza un cociente del valor a la longitud de onda de 458 nm entre el valor a 488 nm (Figura 15F), el cual llamaremos cociente A_0 .

Una vez medidas la excitación de Cerulean WT y Citrine WT por separado, se realizaron co-transfecciones utilizando 100 ng totales de ADN de las construcciones antes mencionadas. De 24 a 48 horas después se midieron los espectros de emisión utilizando longitudes de onda de 458 nm y 488 nm.

El espectro de emisión excitado a 458 nm presenta dos componentes (Figura 15A), uno que corresponde a una parte del espectro de emisión de Cerulean (Figura 15B) y el otro que corresponde al fenómeno conocido como FRET, para poder cuantificar la eficiencia de FRET se tiene que escalar el espectro de Cerulean antes calculado al primer componente (Figura 15C) y restarlo, dejando de este modo sólo el segundo componente (Figura 15D). Para determinar el porcentaje real del espectro sustraído que es explicado por FRET (sí es que lo hay) se deben excitar las células co-transfectadas a 488 nm (Figura 15E). Se obtiene entonces el cociente del espectro sustraído y el espectro obtenido a 488 nm, dicho cociente se conoce como cociente A.

Obtenidos los cocientes A_0 y A se puede calcular la eficiencia aparente de FRET (E_{app}) por medio de la siguiente operación:

$$E_{app} = \text{Cociente } A - \text{Cociente } A_0$$

Si hay transferencia de energía, el valor del cociente A debe aumentar debido al incremento del espectro de emisión de Citrine, es decir, que para que haya FRET el valor del cociente A debe ser mayor al cociente A_0 .

Obtenido el valor de E_{app} , se midió la intensidad tanto del donador (I_d) como del aceptor (I_a), para poder obtener un cociente entre ambas intensidades (I_d/I_a) y hacer una gráfica E_{app} vs I_d/I_a , cabe mencionar que este primer acercamiento se hizo con una proporción donador:aceptor 1:1. Posteriormente se trabajó con diferentes proporciones de donador:aceptor (2:1 y 3:1) para observar el cambio en la gráfica E_{app} vs I_d/I_a y ajustar una curva que describa el comportamiento de las construcciones WT.

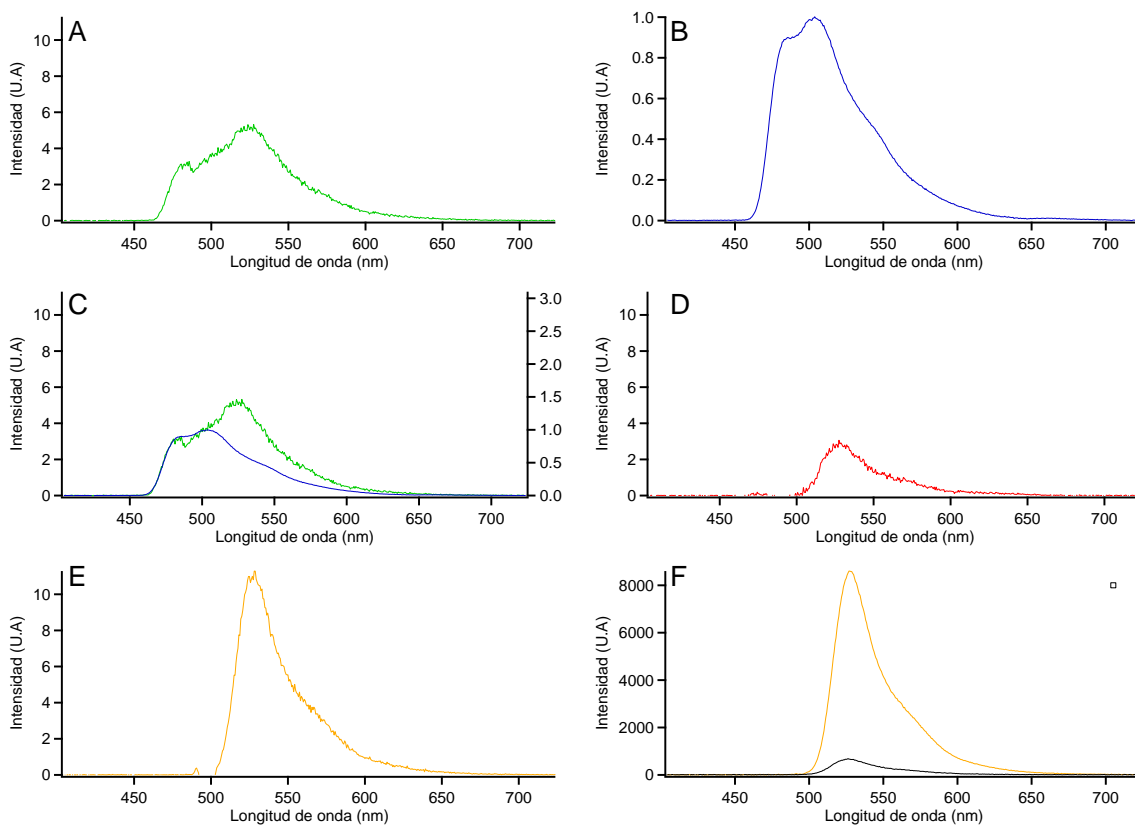


Figura 15. Determinación de la eficiencia aparente de FRET (E_{app}). A corresponde al espectro de emisión de las células co-transfectadas con Cerulean WT y Citrine WT excitadas a 458 nm. B es el espectro de emisión únicamente de Cerulean WT excitado a 458 nm, el cual se escaló en C con el espectro de emisión de las células co-transfectadas. D es el espectro resultante de la

sustracción de A-B. E son los espectros de las células co-transfectadas excitadas a 488 nm (amarillo). F corresponde a los espectros de emisión únicamente de Citrine WT excitado a 458 nm (negro) y 488 nm (amarillo), para poder obtener el cociente conocido como A_0 entre ellos.

De igual forma se realizó el mismo procedimiento antes descrito para las construcciones Cerulean Δ C y Citrine Δ C respectivamente, variando únicamente en la cantidad de ADN total utilizado en las co-transfecciones, siendo en este caso de 50 ng, utilizando las proporciones de donador:aceptor 1:1, 1:2 y 1:4.

Con la finalidad de corroborar si el C-terminal es el único factor determinante en la dimerización del canal se probó una combinación extra, co-transfectando Cerulean WT y Citrine Δ C en las proporciones donador:aceptor 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1 con la misma cantidad de ADN total que en las co-transfecciones WT.

Por último, se utilizó como control negativo la construcción ArcLight, la cual es una fusión entre el VSD de la fosfatasa de *Ciona intestinalis* (CiVSD) y la proteína fluorescente pHluorina súper eclíptica, misma que presenta una mutación en la posición 227, sustituyendo la Alanina por un Ácido Aspártico (Jin *et al.*, 2012). Se optó por esta construcción debido a que la fosfatasa no presenta el C-terminal con las características necesarias para formar el Coiled-coil, para este experimento se utilizaron 200 ng totales de ADN en las co-transfecciones y en las transfecciones individuales de cada construcción 100 ng totales. Las imágenes y datos obtenidos de los experimentos fueron analizados con los programas Image J e Igor Pro (Wavemetrics).

7. Resultados

7.1 Identificación de la secuencia del canal Hv1 de *Acropora millepora*

A partir de las secuencias que parecían corresponder al canal Hv1 en los corales *A. millepora* y *A. digitifera* (XM_015907823.1, XM_015907824.1, XM_029346499.1 y XM_029346498.1) localizadas en el GenBank, se encontró el marco de lectura abierto para cada una de las mismas, lo que permitió a su vez seleccionar un par de las secuencias (XM_015907823.1 y XM_029346499.1) para el diseño de los oligonucleótidos tomando como criterio de selección las regiones conservadas entre ellas. A continuación, se presentan la traducción de las secuencias seleccionadas denominadas A y B.

Traducción de la secuencia A flanqueado por el primer par de oligonucleótidos

MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHR
EKLNELLHGDKIQYAIVVLVIIDIIIVIAELVLDLRAGS

Traducción de la secuencia B flanqueado por el segundo par de oligonucleótidos

MGFTFFKHKMEVFDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVSLIVLLRLWRVTRIVNGIIL
SVQMRAEKKVQAVMKENAELKAELEQLKSKCAQLESELTKQS-

Para realizar un análisis de la posible estructura de las secuencias flaqueadas por los oligonucleótidos, se realizó un modelado por homología de cada una de las secuencias (Figura 16), utilizando el servidor SWISS-MODEL. Para obtener el modelo de ambos fragmentos, se utilizó como molde el PDB: 3WKV, el

cual corresponde a la quimera del canal Hv1 de ratón con el VSD de *Ciona intestinalis* (mHv1cc).

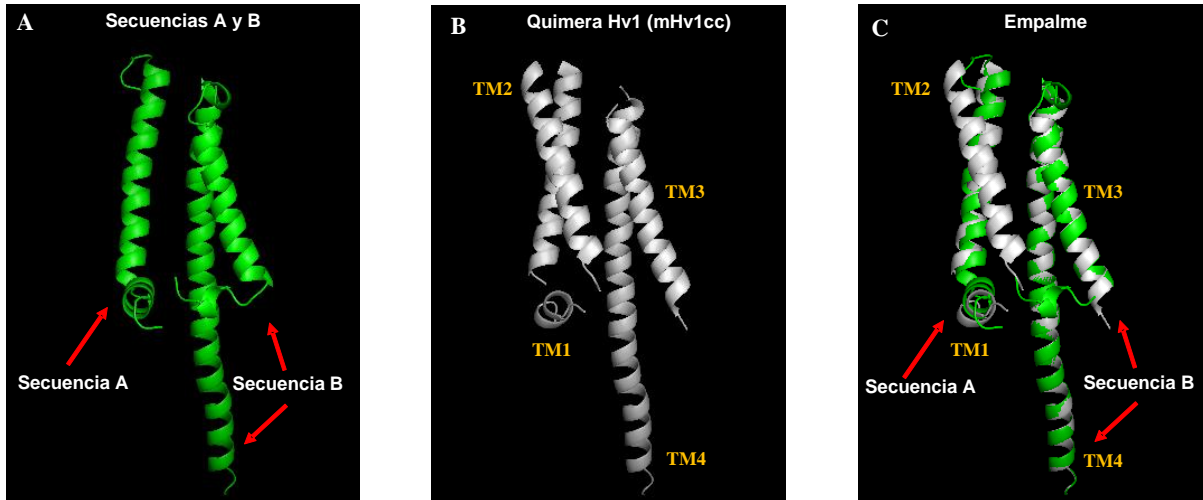


Figura 16. Modelos de las secuencias identificados como Hv1 de *Acropora*.

A) Modelos de las secuencias A y B obtenidos en SWISS-MODEL; B) Hv1 de ratón (PDB: 3WKV); y C) Empalme.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de los modelos, se pudo proponer que la secuencia A corresponde al Amino terminal y parte del primer segmento transmembranal de AmHv1, por otra parte, la secuencia B parece corresponder además de los segmentos transmembranales tres y cuatro al Carboxilo terminal del mismo canal.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede pensar que con el oligonucleótido 5' y 3' de las secuencias A y B respectivamente se podría amplificar la secuencia completa del canal AmHv1.

7.2 Amplificación y clonación del canal Hv1 de *Acropora millepora*

Como se mencionó en el método, se realizó la extracción de ARNtotal de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi (1987) para clonar el posible canal

Hv1 de *A. millepora*. En la figura 17 se observa un análisis por electroforesis de agarosa (al 1.4% en MOPS 1X) del ARN total obtenido del coral. Por otra parte, se determinó la concentración y pureza de la muestra (0.5 µg/µl y 1.8 respectivamente) tomando los valores de absorbancia a 260 nm (para el caso de la concentración) y 280 nm para la pureza (dividiendo los valores a 260 nm/280 nm).

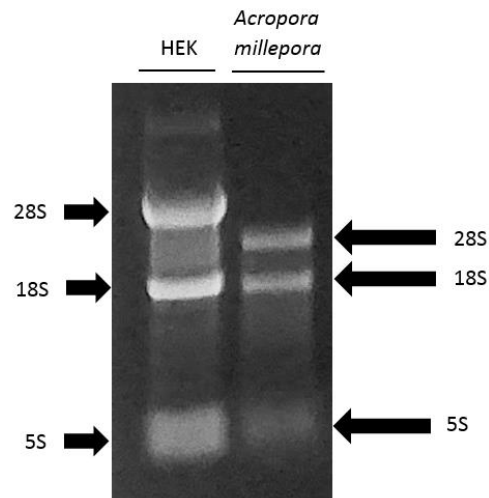


Figura 17. Extracción de ARNtotal de Acropora. Carril 1. ARNtotal de Células HEK293, Carril 2: ARNtotal de *Acropora millepora*. En ambas muestras se muestran los ARNribosomales, 28s, 18s, 5s en HEK293 y sus correspondientes bandas en la muestra de *Acropora*.

Determinados los valores de integridad, concentración y pureza de la muestra del ARN total, se hizo una RT-PCR usando tres pares de oligonucleótidos independientes. Para amplificar las secuencias A y B antes descritas se utilizaron los pares de oligonucleótidos AcHv1 Nter 5' y 3' y AcHv1 Cter 5' y 3' respectivamente, mientras que para amplificar el canal completo teórico se usaron los oligonucleótidos AcHv1 Nter 5' y AcHv1 Cter 3'. En la figura 18 se muestran los resultados de las amplificaciones obtenidas en las reacciones de PCR.

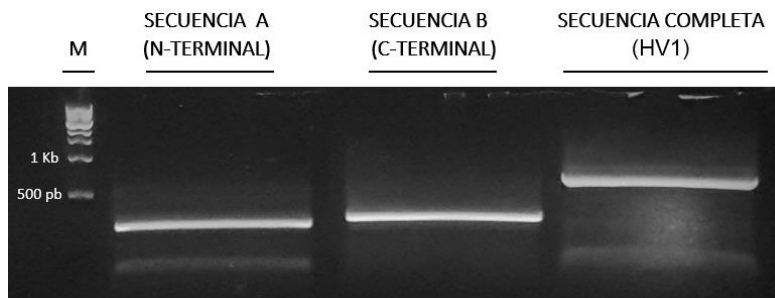


Figura 18. Amplificaciones por RT-PCR de AmH_v1 parcial y completo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb, Carril 2: Amplificación con los oligonucleótidos AcH_v1 Nter 5' y 3'; Carril 3: AcH_v1 Cter 5' y 3'; Carril 4) Amplificación con los oligonucleótidos AcH_v1 Nter 5' y AcH_v1 Cter 3', ésta última combinación nos permitió obtener en canal AmH_v1 completo.

Las tres secuencias amplificadas fueron clonadas de manera independiente en el vector pGEMT para generar más copias y realizar la secuenciación correspondiente. Analizadas las secuencias se corroboró que corresponden justamente a las secuencias A y B, así como a la secuencia completa del canal AmH_v1. A continuación se muestran los alineamientos del putativo canal AmH_v1 con las secuencias A y B así como la secuencia de residuos de aminoácidos del canal.

SecuenciaA AmHv1	CTAGTACCAGACCTGTCCGCTTTCAAAGTGACGCCTGGTTAATTGCATATTTATGAAG -----	SecuenciaA AmHv1	GTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCGTGAGTCTATTGTTTTACTTCGACTTTGGAGAG GTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCGTGAGTCTATTGTTTTACTTCGACTTTGGCGAG *****
SecuenciaA AmHv1	ACCCTTTTAGTGAAGAGAAGTGAAGATCAACATTTGCTATTGATCATCTTGAAGTCC -----	SecuenciaA AmHv1	TAACAAGAATTGTCAACGGAATTATTTGTCCTGCAAAATGCGGGCTGAAAAGAAAGTTC TAACAAGAATTGTCAACGGAATTATTTGTCCTGCAAAATGCGGGCTGAAAAGAAAGTTC *****
SecuenciaA AmHv1	AAACTATTGGTTCATTCCGAGTTCGGGTCTGTCAGAGGATCTCCGTTTCTAGTGAGTT -----	SecuenciaA AmHv1	AAGCGGTGATGAAGGAAAATGCTGAGCTAAAAGCAGAAGCTGAGCAATTGAAGAGCAAGT AAGCGGTGATGAAGGAAAATGCTGAGCTACAAAAGAAGCTGAGCAATTGAAGAGCAAGT *****
SecuenciaA AmHv1	ACCACCAGCATGGGATTCGCAAAATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATG ----- -ATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATG *****	SecuenciaA AmHv1	GTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAAACATTAAGCAAAGCTGAGAGAAGAAAAGAGCGG GTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAAACATTAAGCAAAGCTGA----- *****
SecuenciaA AmHv1	ATCAACTTCCTGCAGATGAACTCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAACAGCTGCAGTGA ATCAACTTCCTGCAGATGAACTCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAACAGCTGCAGTGA *****	SecuenciaA AmHv1	AAGTAAGGTTATCGAGGCGAAAAGTTCATAGTGATACTGCCCTAAATATGATCAGTGATTT -----
SecuenciaA AmHv1	TGGCAAGCACAGTGTGTTTGACGGAAGATGACACGGAATGCCAGCAAAATAGAACCACC TGGCAAGCACAGTGTGTTTGACGGAAGATGACACGGAATGCCAGCAAAATAGAACCACC *****	SecuenciaA AmHv1	TAACAGTTTTGTTAGATTGAAACAAGTTCGTAATAGTGGAATATATTTTTATTTTTAC -----
SecuenciaA AmHv1	GGGAAAACTGAATGAACTACTTCATGGAGATAAGATTGATGATGATGATGATGATGATG GGGAAAACTGAATGAACTACTTCATGGAGATAAGATTGATGATGATGATGATGATGATG *****	SecuenciaA AmHv1	AAAGTACCTAGTTTACTGATGAGTGATAAAAAATATCAACCAAAGCTATAACTTAAGT -----
SecuenciaA AmHv1	TGATCATTGATATCATCATTGTCTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAGAGCAGGATCAG TGATCATTGATATCATCATTGTCTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAGAGCAGGATCAG *****	SecuenciaA AmHv1	GCTGCAAGATAAAAAATTGACCGTTTGTTCCTTAGTGGAAGAAACGTTGAAGTCAT -----
SecuenciaA AmHv1	AACATCATGACAATTCGCATCTCATGCTCCTGCACTATATCAGTATTGCCATCCTATCAG AACATCATGACAATTCGCATCTCATGCTCCTGCACTATATCAGTATTGCCATCCTATCAG *****	SecuenciaA AmHv1	TTCGAAAATATAGGAGATGATCCTTTTTTTTTAATTAGTGCAGACAAGCAATTGTGTA -----
SecuenciaA AmHv1	TCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACATTTTTCAAGCACA TCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACATTTTTCAAGCACA *****	SecuenciaA AmHv1	AAATTTGTAAGCAATTCATAGAGAATAATTTTGTATTTTAAGACTTTTATGATTGCC -----
SecuenciaA AmHv1	AAATGGAGGTGTTGATGGCTTTGTTATAAATTGTGTCATTTGCCCTGGATATTGCCTTCA AAATGGAGGTGTTGATGGCTTTGTTATAAATTGTGTCATTTGCCCTGGATATTGCCTTCA *****	SecuenciaA AmHv1	TTAAAGTTAAAGAGAATTACTCAAAAGAACGCAAGATTAAATATCAGTGATTTCTTTG -----
		SecuenciaA AmHv1	ATTATCAGAGAGTCCTTTTTATAATGTAATCATCTTGTATTTACCATATAGGATAAGT -----
		SecuenciaA AmHv1	TGTACTTTCACCTGTGGTGTATTAAAATGTGGAAAAGAAAATAAAAATGAAACCTTG -----

Figura 19. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos entre la secuencia A con el putativo canal AmHv1. Los aminoácidos con * son 100% idénticos, los que presentan : son aquellos que presentan propiedades similares, los que no tienen ningún signo son aminoácidos completamente diferentes.

SecuenciaB AmHv1	ACCCCTTTTAGTGAAGAGAAGTGAAGATCAACATTTGCTATTGAGTATTGCGATTAAATG -----	SecuenciaB AmHv1	TATTGCCTTCAGTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCGTGAGTCTATTGTTTTACTTTCG TATTGCCTTCAGTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCGTGAGTCTCATTGTTTTACTTTCG *****
SecuenciaB AmHv1	TGATCACAGCTAAGATGTTTGATCACCAGTAAAAATAGTTTGTCTGAAATTATAGTCA -----	SecuenciaB AmHv1	ACTTTGGAGAGTAACAAGAATTGTCAACGGAATTATTGTCCTGCAAAATGCGGGCTGA ACTTTGGCGAGTAACAAGAATTGTCAACGGAATTATTGTCCTGCAAAATGCGGGCTGA *****
SecuenciaB AmHv1	TCTTGAAGTCCAAACTATTGGTTCATTTCCGAGTCCGGGTCTGTGAGGATCTCCGTT -----	SecuenciaB AmHv1	AAAGAAAGTTCAGCGGTGATGAAGGAAAATGCTGAGCTAAAAGCAGAATTGAGCAATT AAAGAAAGTTCAGCGGTGATGAAGGAAAATGCTGAGCTACAAAAGAACTTGAAGCAATT *****
SecuenciaB AmHv1	TCTAGTGAGTTACCACCAGCATGGGATTTCCGAAATGATTGATGCAAGAACCAGACGATC ----- *****	SecuenciaB AmHv1	GAAGAGCAAGTGTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAACATTAAAGCAAAGCTGAGAAGA GAAGAGCAAGTGTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAACATTAAAGCAAAGCTG----- *****
SecuenciaB AmHv1	GAGCATGGATGATCAACTTCTGAGATGAATCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAAC GAGCATGGATGATCAACTTCTGAGATGAATCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAAC *****	SecuenciaB AmHv1	GAAAAGAGCGGAAGTAAAGTTATCGAGGCGAAAGTTCATAGTGATACTGCCCTAAATATG -----
SecuenciaB AmHv1	AGCTGCAGTGTGGCAAGCACAGTGTGTTGACGGAAAGATGACACGGAATGCCAGCAAA AGCTGCAGTGTGGCAAGCACAGTGTGTTGACGGAAAGATGACACGGAATGCCAGCAAA *****	SecuenciaB AmHv1	ATCAGTGATTTAAACAGTTTTGTTAGATTGAAACAAGTTCGTAATAGTGGAATATATT -----
SecuenciaB AmHv1	TAAGAACCACCGGAAAACTGAATGAACACTTTCATGGAGATAAGATTGAGTATGCCAT TAAGAACCACCGGAAAACTGAATGAACACTTTCATGGAGATAAGATTGAGTATGCCAT *****	SecuenciaB AmHv1	TTTTTTTTTACAAAGTACCTAGTTTACTGATGAGTGATAAAAAATATCAACCAAAGTCT -----
SecuenciaB AmHv1	TGTAGTTTTAGTGATCATTGATATCATCATTGTCATTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAG TGTAGTTTTAGTGATCATTGATATCATCATTGTCATTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAG *****	SecuenciaB AmHv1	ATAACTTAAGTGCTGCAAGATAAAAAATTGACCGTTTGTTCCTTAGTGGAAGAAAC -----
SecuenciaB AmHv1	AGCAGGATCAGAATCATGACAATTCGCATCTCATGTCCTGCACATATCAGTATTGC AGCAGGATCAGAATCATGACAATTCGCATCTCATGTCCTGCACATATCAGTATTGC *****	SecuenciaB AmHv1	GTTGAAGTCATTTGAAAAATATAGGAGATGATCCTTTTTTTTAAATTAGTGCTCAGACAA -----
SecuenciaB AmHv1	CATCCTATCAGTCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACATT CATCCTATCAGTCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACATT *****	SecuenciaB AmHv1	GCAATTGTGTAATAATTGTAAGCAATTCATAGAGAATAATTTTTGATTTTAAAGACTT -----
SecuenciaB AmHv1	TTTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTGATGGCTTTGTTATAATTGTGTCATTGCTTGGATGGA TTTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTGATGGCTTTGTTATAATTGTGTCATTGCTTGGATGGA *****	SecuenciaB AmHv1	TTATGATTGCCTTAAAGTTAAAGAGAAATATCACTCAAAGAACGCAAGATTAATATCAG -----
		SecuenciaB AmHv1	TGATTTCTTGATTATCAGAGAGTCTTTTTTATAATGTAATCATCTGTATTATTACCAT -----
		SecuenciaB AmHv1	ATAGGATAAGTTGTAATTTCTACCTGTGTGGTGTATTAATAATGTAAGAAAGAAATAAAA -----
		SecuenciaB AmHv1	ATGAAACCTTG -----

Figura 20. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos entre la secuencia B con el putativo canal AmHv1. Los aminoácidos con * son 100% idénticos, los que presentan : son aquellos que presentan propiedades similares, los que no tienen ningún signo son aminoácidos completamente diferentes.

Secuencia en aminoácidos del canal Hv1 de *Acropora millepora*

MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHR
EKLNELLHGDKIQYAIIVLVIIDIIIVIAELVLDLRAGSEHHDNSASHVLHYISIALSVF
MIELLLKIYAMGFTFFKHKMEVFDGFIIVSFALDIASFNEQGGVDGVSILVLLRLW
RVTRIVNGIILSVQMRAEKKVQAVMKENAELQKELEQLKSKCAQLESELTTLKQS-

A partir de la secuencia del canal AmHv1, se realizó un modelado por homología en el servidor SWISS-MODEL, utilizando el PDB del canal mHv1cc (3WKV). En la figura 21 se observa la comparación del modelo computacional obtenido para el AmHv1 con la quimera de ratón.

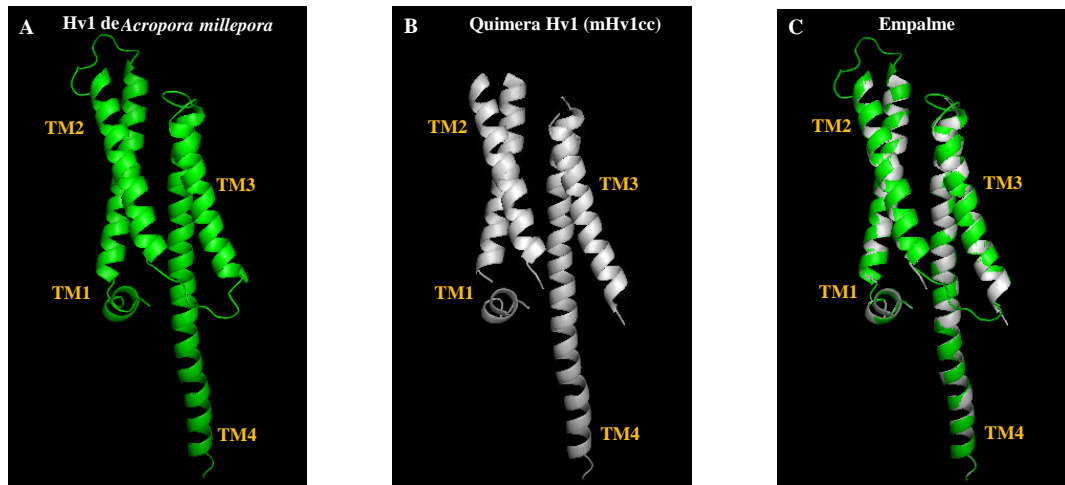


Figura 21. Modelo estructural del canal Hv1 de *Acropora millepora*.

A) Modelo computacional del canal AmHv1 obtenido en SWISS-MODEL; B) Quimera Hv1 (PDB: 3WKV); y C) *Empalme*.

Clonada y caracterizada la secuencia del canal AmHv1, se realizó una subclonación de dicha secuencia ahora en el plásmido pcDNA3.1, el cual es un vector de expresión en células de mamífero. Esta construcción fue utilizada para la expresión transitoria del canal de estudio en células HEK293. Este sistema de expresión heteróloga nos permite realizar la caracterización electrofisiológica del nuevo canal.

7.3 Obtención de la fusión del canal AmHv1 y AmHv1ΔC con las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine

Como se mencionó en el método, para obtener la fusión de las proteínas fluorescentes con el canal AmHv1 se utilizó la técnica PCR *overlap*, como primer punto se amplificaron los canales AmHv1 y AmHv1ΔC. En la figura 22 se muestran

las amplificaciones obtenidas en la PCR1 para WT, ΔC y las proteínas Citrine y Cerulean. Como se observa en la Figura 22, los tamaños del WT y el ΔC difieren un poco como es de esperarse, siendo de 700 pb el canal completo y de 580 pb el canal deletado. En el caso de las amplificaciones de las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine, se obtuvo también el peso esperado de 800 pb en ambos casos.

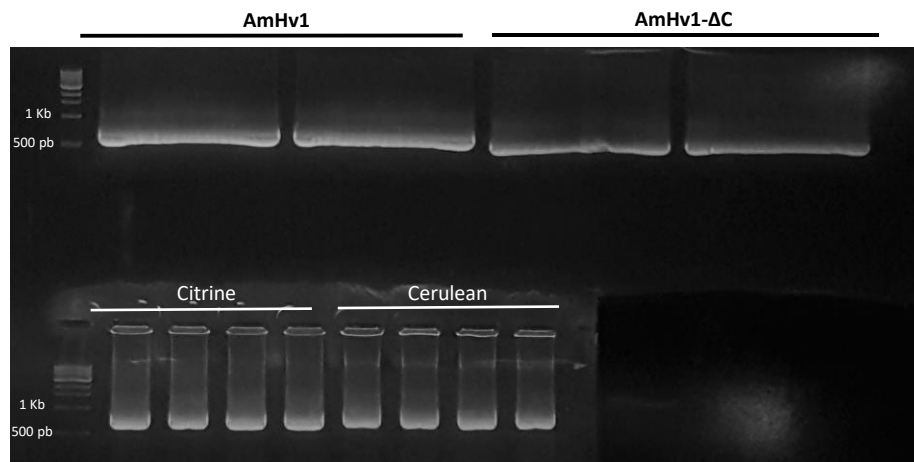


Figura 22. Productos de PCR1. En la parte superior se muestran las bandas correspondientes al canal AmHv1 y AmHv1 ΔC , siendo el primero de aproximadamente de 700 pb, mientras el segundo de 580 pb. En la parte inferior se muestran las bandas correspondientes a Citrine y Cerulean las cuales tienen un peso de 800 pb. (Para todas las amplificaciones se realizó 2 reacciones de PCR para obtener una cantidad suficiente de molde para iniciar la PCR2).

Al realizarse la PCR2 se obtuvieron las cuatro fusiones (denominadas a partir de este momento como construcciones) necesarias para el estudio de la estequiometría del canal. Se conserva la pequeña diferencia entre las construcciones WT y ΔC (Figura 23) cuyos pesos moleculares son de 1.5 kb y 1.4 kb respectivamente.

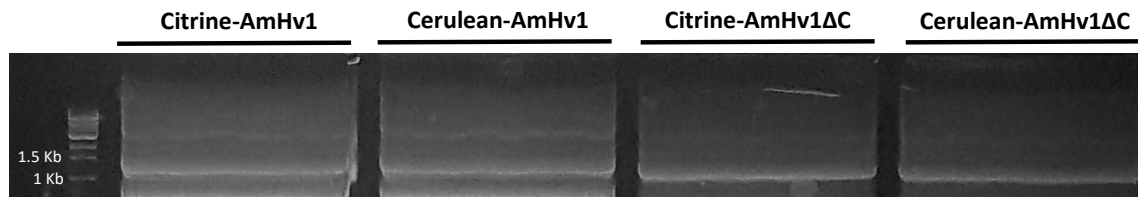


Figura 23. Producto de PCR2. Se muestran las bandas de las cuatro fusiones de las proteínas, siendo las construcciones con AmHv1 más pesadas (1.5 Kb) que las construcciones con AmHv1ΔC (1.4 Kb).

Una vez obtenidas las fusiones cada una de ellas fueron clonadas en el vector pcDNA3.1 en los sitios KpnI y NotI. Estas construcciones fueron utilizadas para obtener las imágenes de microscopia confocal y para realizar el análisis por FRET.

7.4 Distribución del canal AmHv1 en células HEK293

Las construcciones AmHv1 WT y ΔC fusionadas con las proteínas fluorescentes fueron expresadas en células HEK293 y analizadas en microscopia confocal como un primer acercamiento para conocer la distribución de las mismas. Se adquirieron diferentes imágenes a 63X de células HEK293 expresando cada una de las construcciones por separado. En cada figura se presentan cortes de 1 μm en el eje Z (Figura 24 y 25).

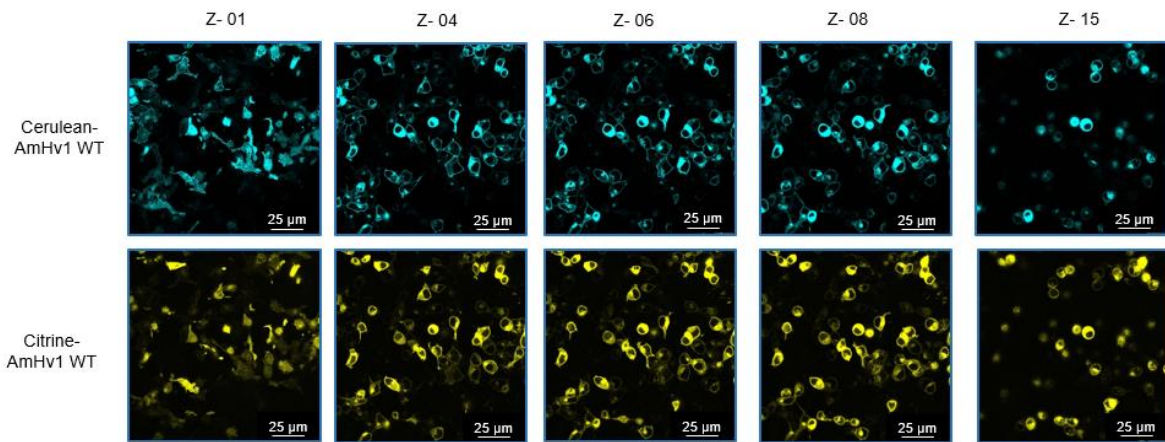


Figura 24. Fotos en microscopia confocal a 63X de las construcciones Cerulean WT y Citrine WT. En la fila superior se muestran las células HEK 293 transfectadas con Cerulean WT en diferentes planos del eje Z, únicamente cuando es excitada a 458 nm. En la fila inferior se encuentra la construcción Citrine WT en los mismos planos del eje Z que Cerulean WT, la cual responde con fluorescencia exclusivamente al ser excitada a 488 nm.

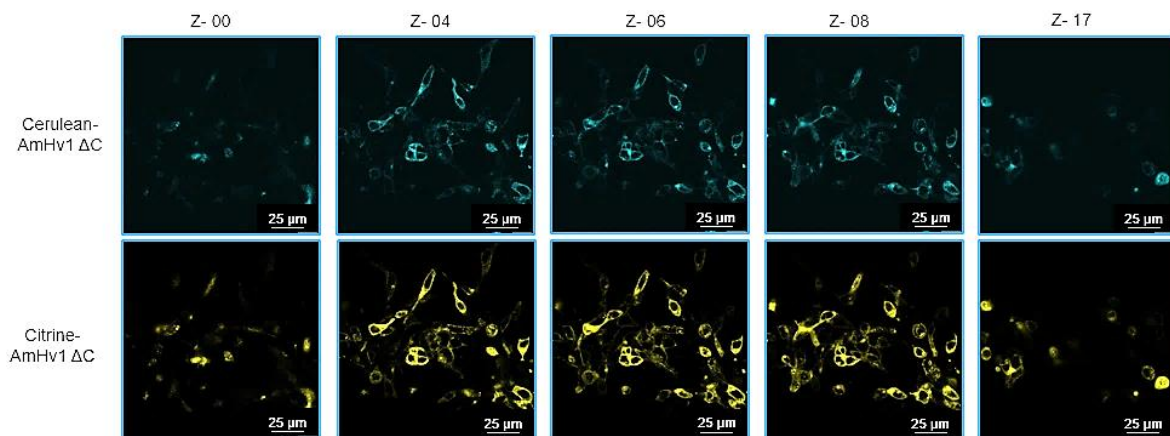


Figura 25. Fotos en microscopia confocal a 63X de las construcciones Cerulean ΔC y Citrine ΔC. En la fila superior se muestran la construcción Cerulean ΔC en diferentes planos del eje Z, excitada a 458 nm. En la fila inferior se encuentra la construcción Citrine ΔC en los mismos planos del eje Z que Cerulean ΔC, la cual responde con fluorescencia exclusivamente al ser excitada a 488 nm.

Como se puede observar en la Figura 24 y 25, es probable que la distribución del canal AmHv1 (fusionado a Cerulean o Citrine) sea en el citoplasma y membrana plasmática. Este mismo resultado se observó en las dos construcciones de AmHv1 ΔC fusionado a las mismas proteínas fluorescentes. Lo anterior indica que la

eliminación del C-terminal aparentemente no altera la distribución del canal en la célula.

Por otra parte, cuando se realizaron las co-transfección en proporción 1:1 de las construcciones: Citrine-AmHv1:Cerulean-AmHv1; Citrine-Hv1 Δ C:Cerulean Hv1 Δ C y Citrine-AmHv1 Δ C:Cerulean-AmHv1, para todos casos se observó la misma distribución del canal AmHv1 WT y Δ C que la observada para las transfecciones independientes (Figura 26).

En las co-transfecciones se puede observar que los canales WT y Δ C independientemente de las combinaciones expresadas, siempre se expresan en el citoplasma y en la membrana plasmática. Otro punto importante es que al obtener la combinación de las imágenes obtenidas excitando a 458 nm y 488 nm se presenta una colocación de la señal en todos los casos.

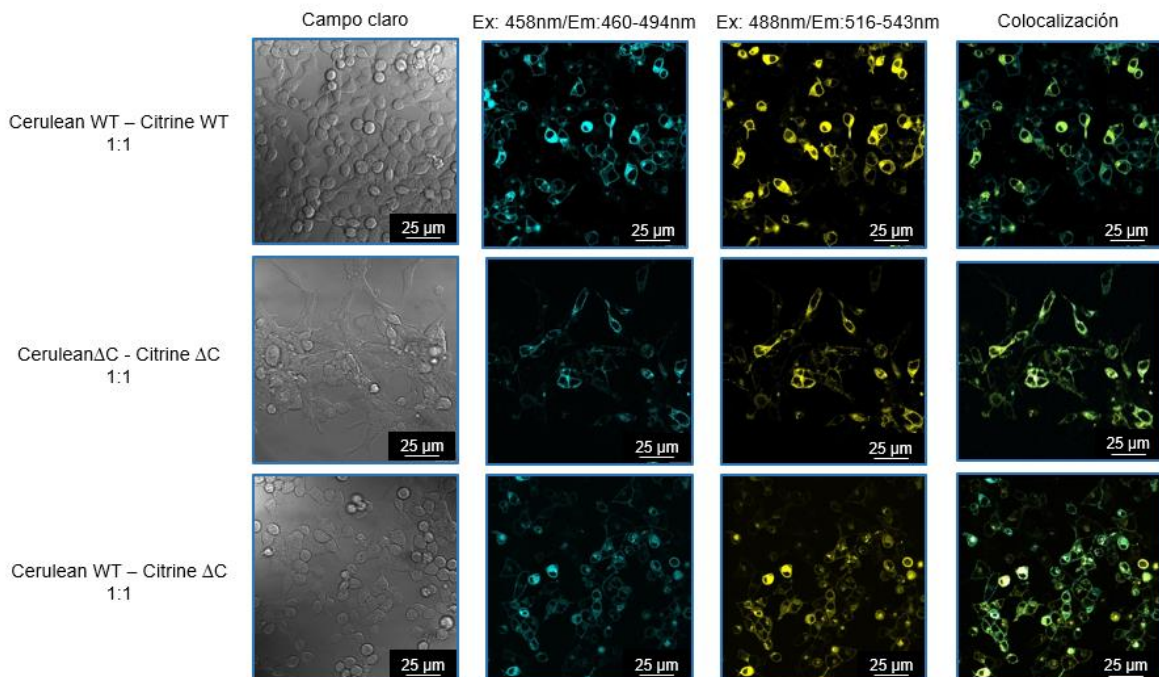


Figura 26. Distribución de Cerulean WT, Citrine WT, Cerulean Δ C y Citrine Δ C cotransfectados en células HEK293. Se muestra la fluorescencia de tres combinaciones de las construcciones en células HEK293 a 63X excitadas a 458 nm y 488 nm así como la co-localización

de las mismas. La hilera superior corresponde a la combinación WT, la hilera de en medio a la combinación ΔC y la hilera inferior a la combinación WT- ΔC .

7.5 Registros electrofisiológicos

Una vez que se verificó que las construcciones tienen la misma distribución celular, se hicieron los registros electrofisiológicos de cada una de ellas con la finalidad de comprobar si la fusión con Cerulean o Citrine afectaban o no la actividad del canal. Para ello se obtuvieron las familias de corrientes tanto de las construcciones WT (Figura 27A) como de las construcciones ΔC (Figura 28A) mediante la técnica de *Patch clamp* en configuración *inside-out*, en células HEK293 transfectadas con cada una de las construcciones.

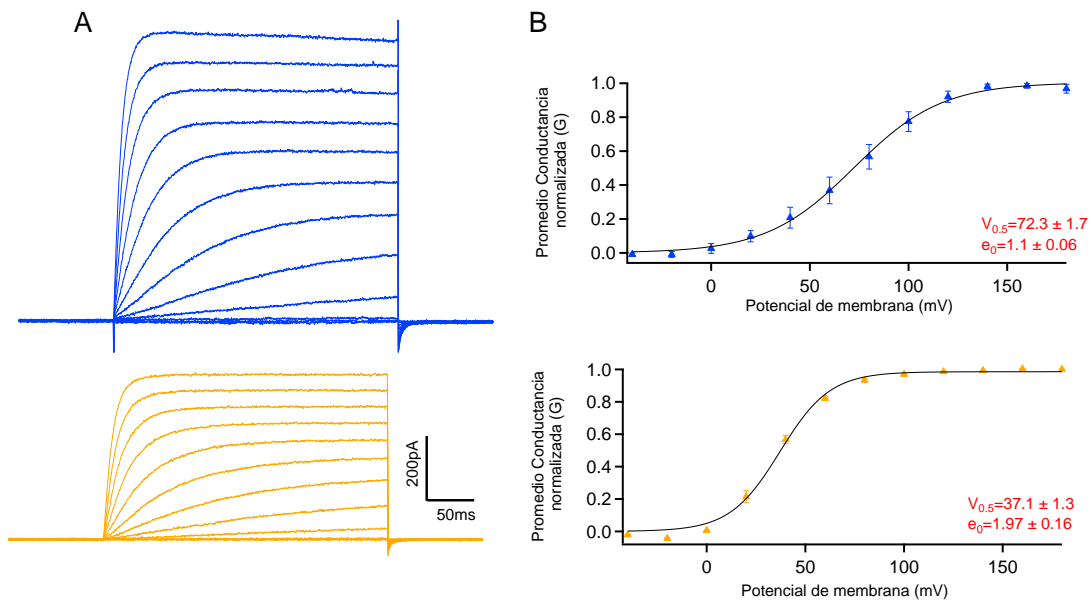


Figura 27. Registros electrofisiológicos construcciones de H_v1 WT. A) Familias de corrientes representativas de las construcciones Cerulean WT (azul) y Citrine WT (amarillo) dadas por una despolarización que va de -40 a 180 mV en intervalos de 20 mV. B) Curvas del promedio de las Conductancias normalizadas vs voltaje ($G_{norm}-V$) de los registros obtenidos de Cerulean WT ($n=6$) y Citrine WT ($n=7$) a un ΔpH 0.5.

A partir de las familias de corrientes se obtuvieron las gráficas Corriente vs Voltaje (IV) y subsecuentemente la conductancia de las mismas para graficarlas una vez normalizadas contra el voltaje (Figuras 27B y 28B). De acuerdo con estos resultados podemos concluir que las cuatro construcciones son funcionales al presentar corrientes iónicas al despolarizar la membrana.

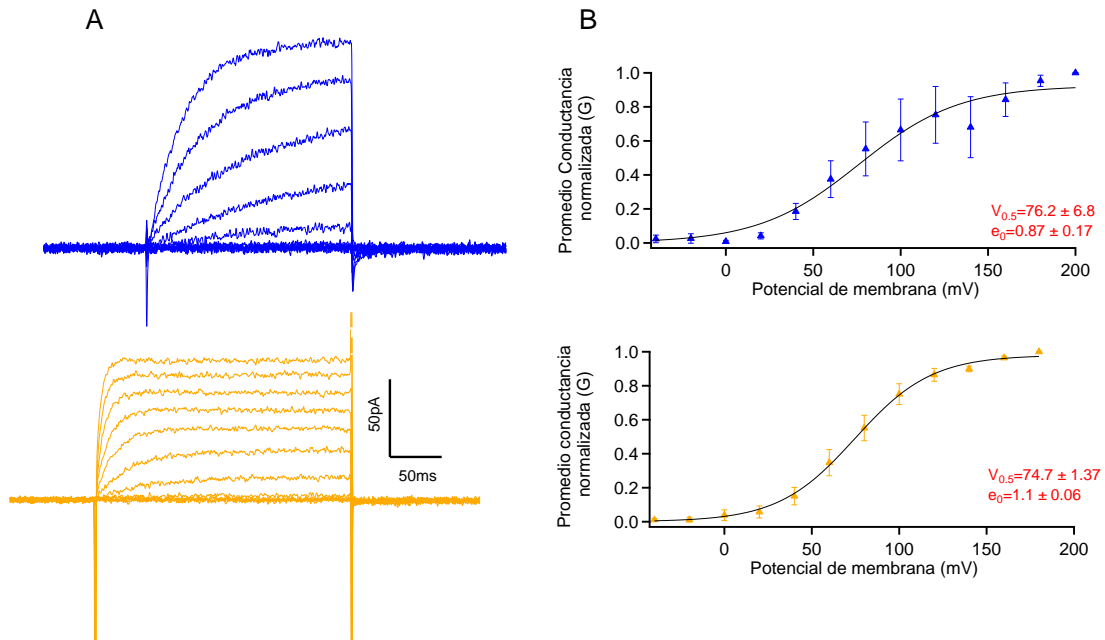


Figura 28. Registros electrofisiológicos de las construcciones ΔC . A) Familias de corrientes representativas de las construcciones Cerulean ΔC (azul; $n=4$) y Citrine ΔC (amarillo; $n=7$) obtenidas con un protocolo de corriente que va de -40 a 180 mV en intervalos de 20 mV. B) Curvas del promedio de las Conductancias normalizadas vs voltaje de los registros obtenidos a un ΔpH 0.5.

7.6 Eficiencia aparente de FRET

Como ya se mencionó, en este trabajo se utilizó la técnica FRET para determinar la estequiometría del canal AmHv1, para ello se obtuvieron imágenes de la fluorescencia en células transfectadas y co-transfectadas con las diferentes construcciones, así como su respectivo campo claro, además se delimitó una

sección de la membrana para obtener el espectro de emisión de la misma (Figura 29 y 30).

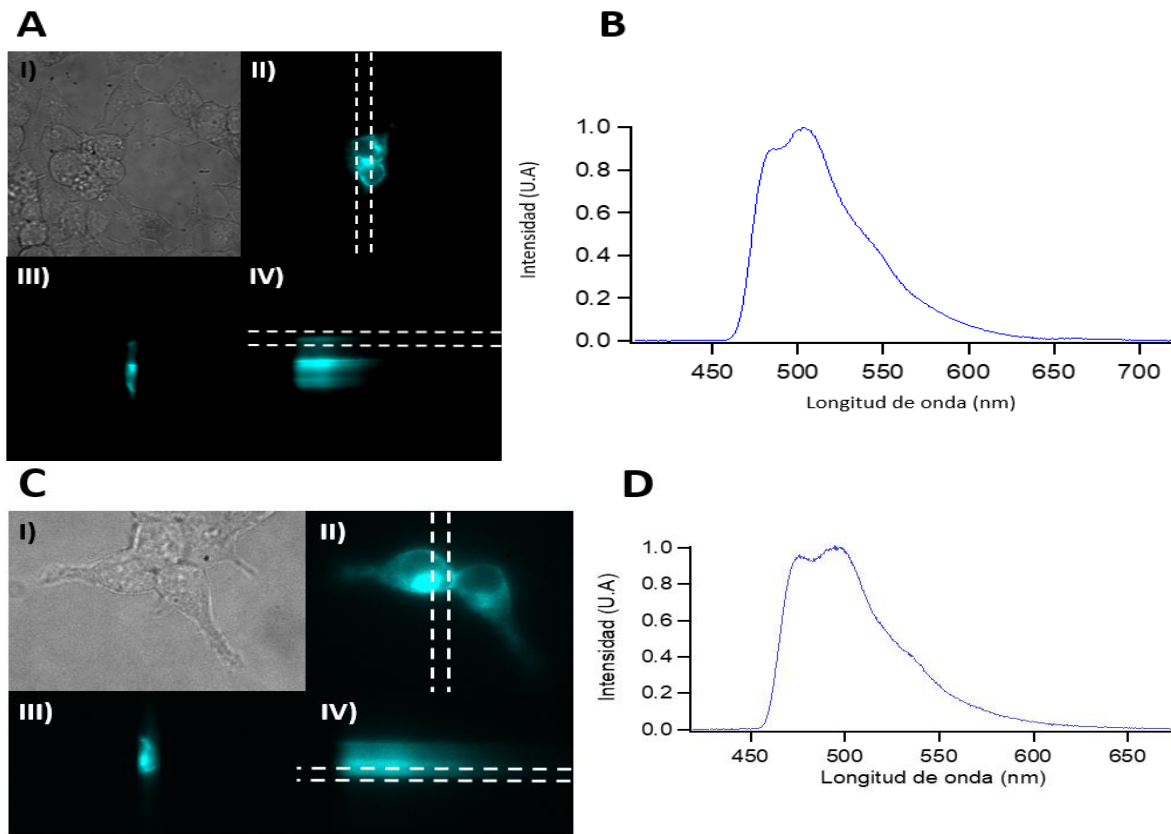


Figura 29. Espectro de emisión de Cerulean WT y ΔC . A y C muestra el método de cómo es la obtención del espectro de Cerulean, en I) se toma una fotografía en campo claro de la célula de interés, posteriormente en II) se toma la fluorescencia de la misma, y se elige una pequeña área que delimite una parte de la fluorescencia de la membrana como se aprecia en III), por último, en IV) se toma el espectro de emisión. B y D corresponden a las gráficas del espectro obtenido.

Como siguiente paso hacia el estudio de la estequiometría por medio de FRET se tiene que obtener el cociente A_0 , para ello se mide tanto la excitación normal (a 488 nm) como la excitación directa del aceptor (a 458 nm) (Figura 30B y D), entendiéndose como excitación directa al espectro de emisión dado a la longitud de onda en que se excita el donador. Teniendo ambos espectros se divide el obtenido a 458 nm entre el de 488 nm.

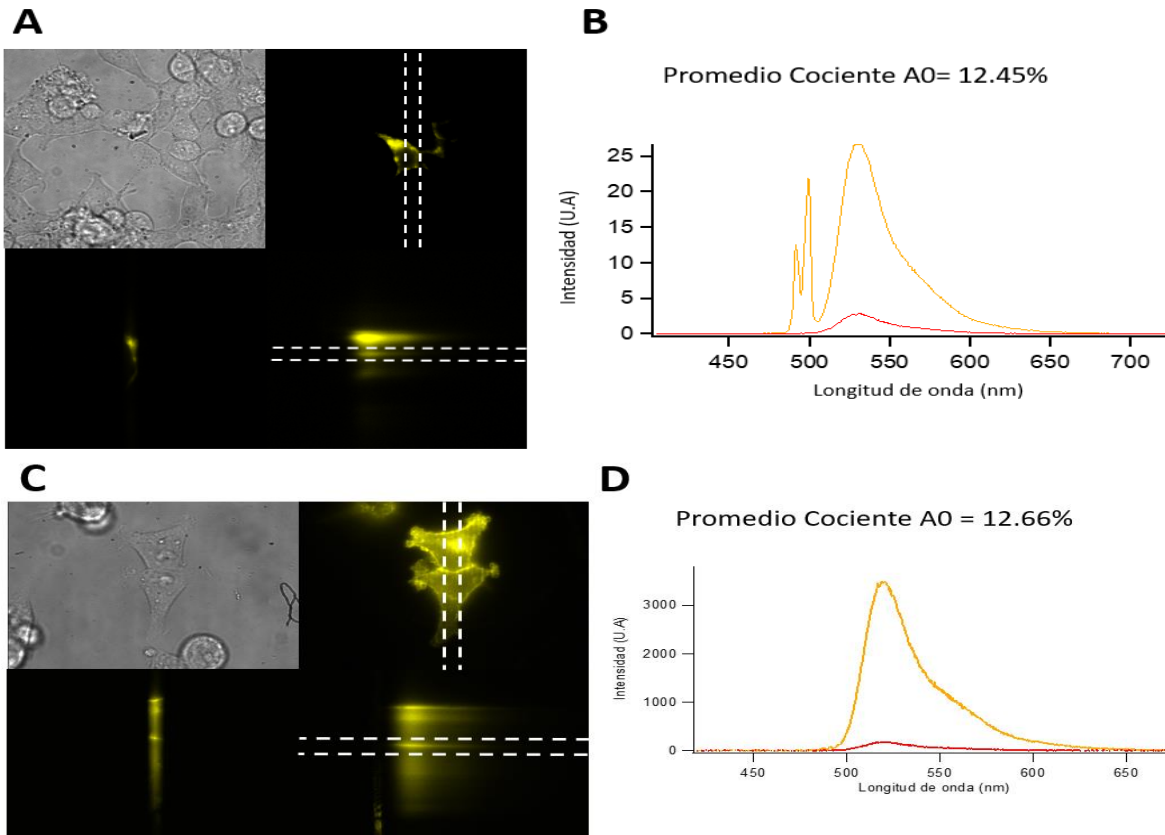


Figura 30. Espectro de emisión de Citrine WT y ΔC . En A y C se muestra el método de cómo es la obtención del espectro de Citrine. B y D corresponde a los espectros de emisión de Citrine excitados a 488 nm (amarillo) y 458 nm (rojo), además se muestra el porcentaje promedio del cociente A_0 tanto para WT como para ΔC .

Como primer experimento se co-transfectaron las construcciones Cerulean y Citrine WT (Figura 31), calculando la E_{app} así como la intensidad del donador y aceptor (I_d e I_a) tal como se mencionó en el método, para que de esta manera se pueda graficar la E_{app} vs el cociente de las intensidades (I_d/I_a) (Figura 32).

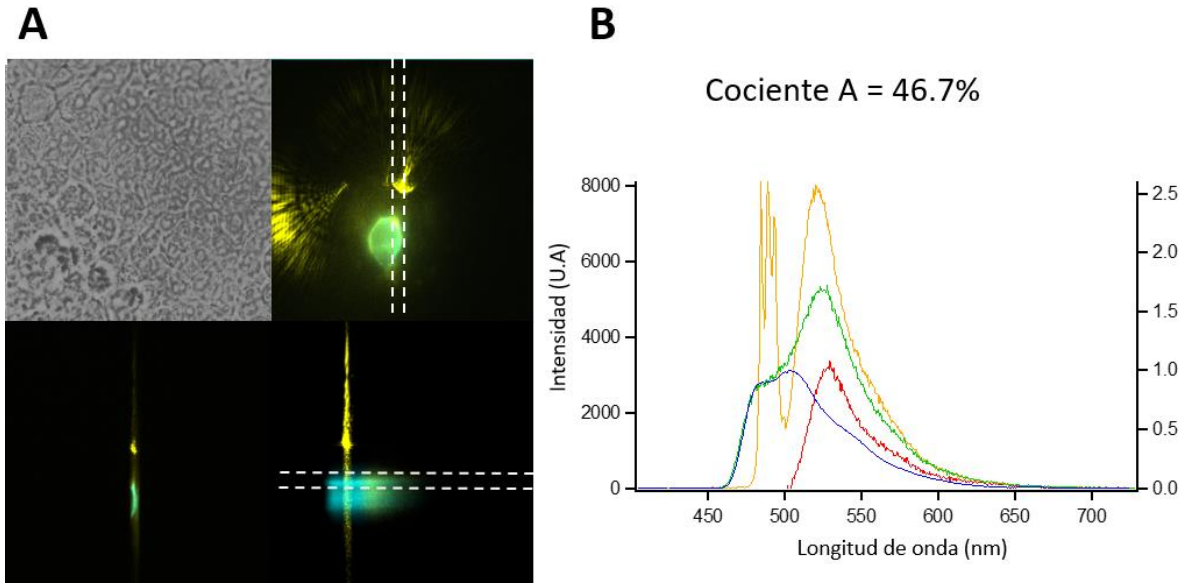


Figura 31. Co-expresión de las construcciones Cerulean y Citrine WT. En A se muestra el método de cómo es la obtención de espectro de emisión al co-expresarse Cerulean WT y Citrine WT resultado de FRET. B corresponde a los espectros de emisión de Cerulean excitado a 458 nm (azul) y Citrine excitado a 488 nm (amarillo). En verde se muestra el espectro de Cerulean y Citrine resultado de la transferencia de energía y en rojo el espectro sustraído del mismo, además se muestra el porcentaje del cociente A del experimento.

En el caso de esta primera combinación se utilizaron las proporciones de donador:aceptor 1:1, 2:1 y 4:1 con una n de 134 células en total, así mismo se hizo un ajuste en la gráfica (Figura 32B) para determinar que comportamiento tiene el canal, es decir, si realmente funciona como un dímero.

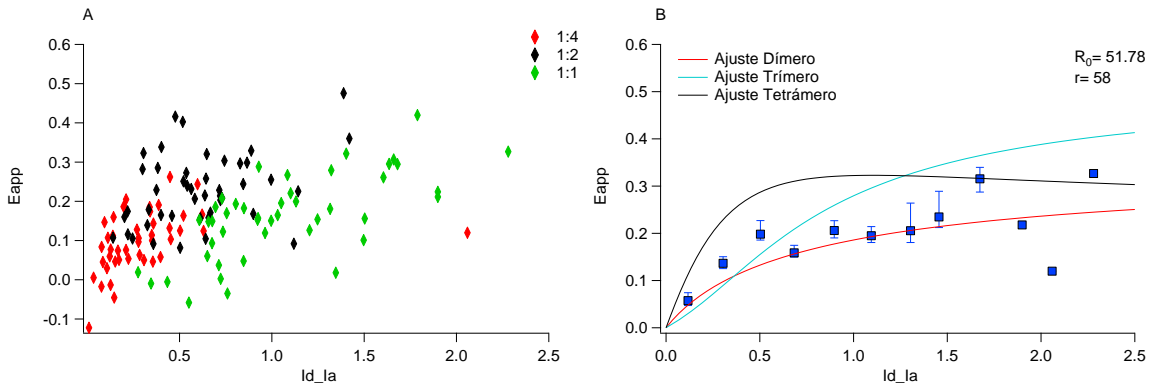


Figura 32. Eficiencia aparente de FRET en Cerulean WT – Citrine WT. Se muestran dos gráficas de E_{app} vs I_d/I_a . A corresponde a la gráfica en donde se observan diferentes concentraciones de donador-aceptor. B es el promedio de los puntos tomados en A tanto para el eje X como el Y, junto con los ajustes de dímero, trímero y tetrámero para la misma gráfica.

Como siguiente combinación se co-transfectaron las construcciones Cerulean y Citrine ΔC (Figura 33), para verificar si realmente el C-terminal es el factor determinante en la dimerización del canal AmHv1, por lo cual se graficó de igual manera la E_{app} vs I_d/I_a de esta combinación (Figura 35) en la que se utilizaron las proporciones de donador:aceptor 2:1 y 3:1 con una n de 116 células totales.

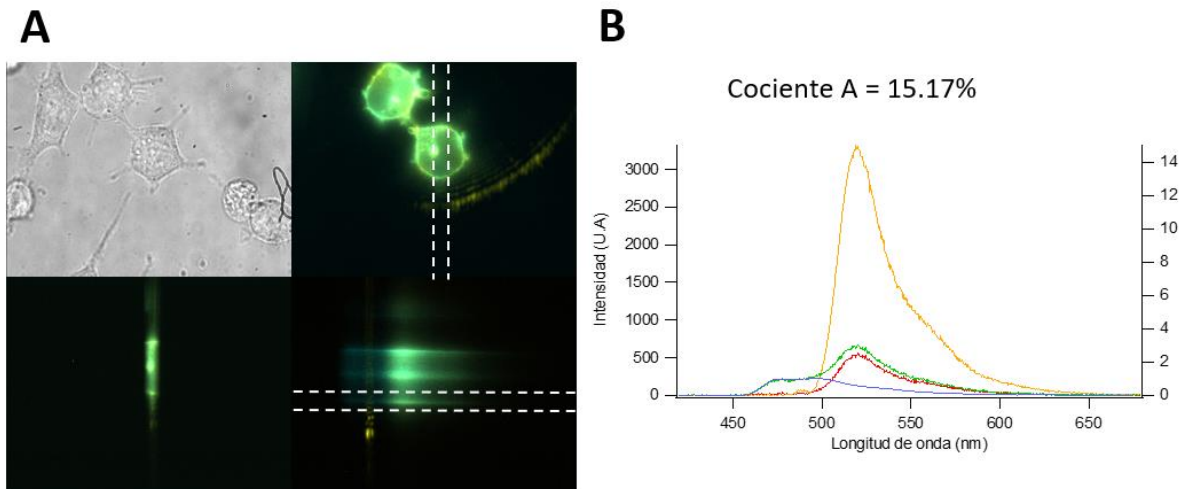


Figura 33. Co-expresión de las construcciones Cerulean y Citrine ΔC . En A se muestra el método de cómo es la obtención de espectro de emisión al co-expresarse Cerulean ΔC y Citrine ΔC resultado de FRET. B corresponde a los espectros de emisión de Cerulean excitado a 458 nm (azul) y Citrine excitado a 488 nm (amarillo). En verde se muestra el espectro de Cerulean y Citrine

resultado de la transferencia de energía y en rojo el espectro sustraído del mismo, además se muestra el porcentaje del cociente A del experimento.

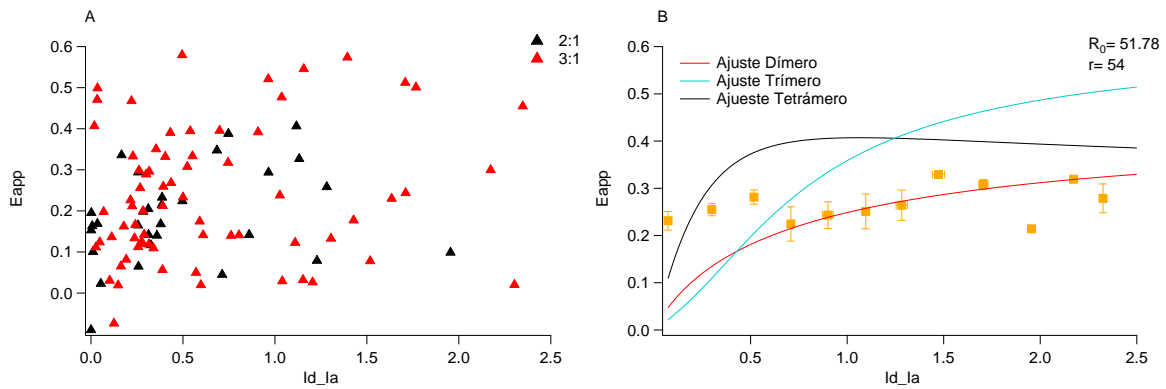


Figura 34. Eficiencia aparente de FRET en Cerulean ΔC – Citrine ΔC . Se muestran dos gráficas de E_{app} vs I_d/I_a . A) corresponde a la gráfica en donde se observan la dispersión de datos del par FRET. B) es el promedio de la dispersión de datos captados en A en ambos ejes, junto con los ajustes para la misma gráfica.

Dado que se encontró FRET en la combinación ΔC , se decidió hacer una tercera combinación entre Cerulean WT y Citrine ΔC (Figura 35) para ver si existe E_{app} y de esta manera estudiar si hay una interacción entre ellos, lo que nos permitiera seguir caracterizando el papel del C-terminal en la formación de canal dimérico. Para esta combinación se utilizaron las proporciones donador:aceptor 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 1:2 con una n de 150 células totales (Figura 36).

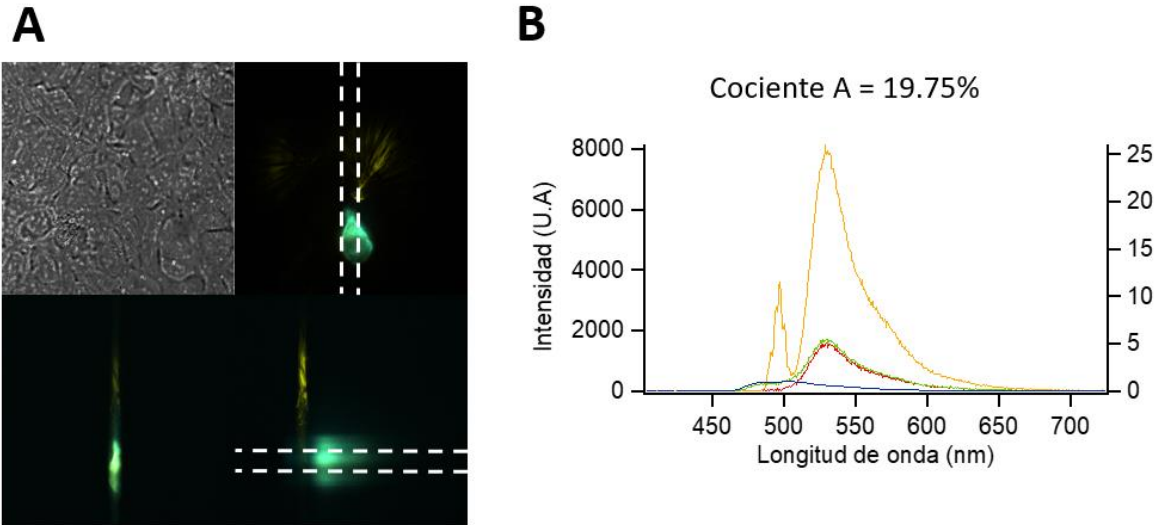


Figura 35. Co-expresión de las construcciones Cerulean WT y Citrine Δ C. En A se muestra el método de cómo es la obtención de espectro de emisión al co-expresarse Cerulean WT y Citrine Δ C resultado de FRET. B corresponde a los espectros de emisión de Cerulean excitado a 458 nm (azul) y Citrine excitado a 488 nm (amarillo). En verde se muestra el espectro de Cerulean WT y Citrine Δ C resultado de la transferencia de energía y en rojo el espectro sustraído del mismo, además se muestra el porcentaje del cociente A del experimento.

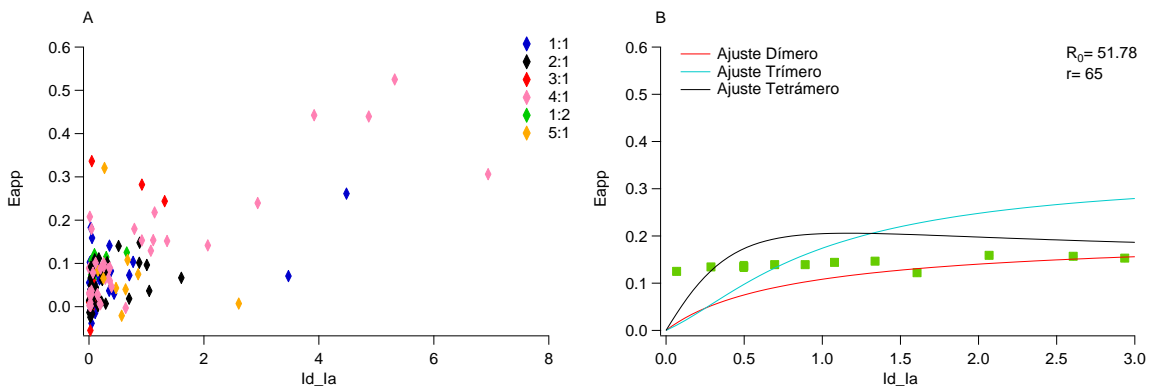


Figura 36. Combinación Cerulean WT-Citrine Δ C. Graficas de la E_{app} vs $I_{d/la}$
 1a. A Muestra la dispersión de datos del donador:aceptor de 6 diferentes proporciones. B Promedio de la dispersión de datos mostrada en A junto con tres ajustes a la gráfica.

Para corroborar los resultados obtenidos en las combinaciones anteriores, se utilizó como control negativo una cuarta combinación entre la construcción ArcLight (Donador) y Citrine WT (aceptor) (Figura 36).

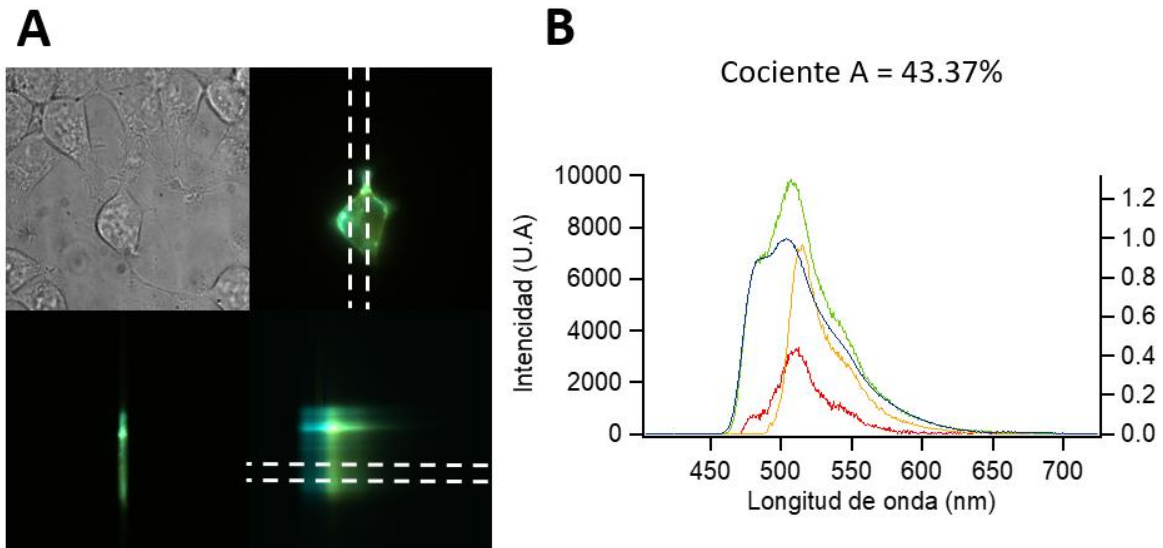


Figura 37. Control negativo. En A se muestra el método de cómo es la obtención de espectro de emisión al co-expresarse Cerulean WT y ArcLight resultado de FRET. B corresponde a los espectros de emisión de Cerulean excitado a 458 nm (azul) y ArcLight excitado a 488 nm (amarillo). En verde se muestra el espectro de Cerulean WT y ArcLight resultado de la transferencia de energía y en rojo el espectro sustraído del mismo, además se muestra el porcentaje del cociente A del experimento.

ArcLight es una fusión entre una pHluorina y el CiVSD la cual no presenta el C-terminal que es necesario para la formación del Coiled-Coil, lo cual hace que esta construcción sea un candidato perfecto para ser un control negativo.

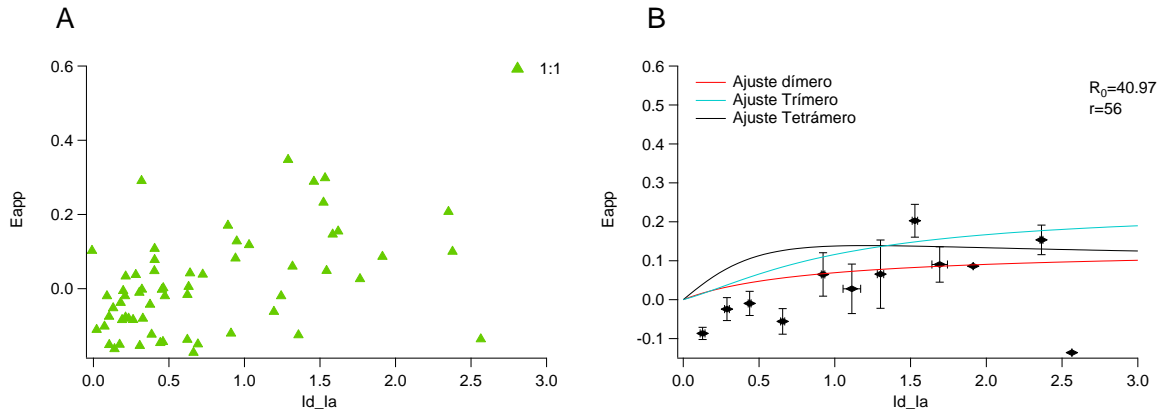


Figura 38. Control negativo FRET. Gráficas E_{app} vs I_d/I_a de la combinación ArcLight y Citrine WT. A Dispersión de datos en la proporción 1:1 de donador:aceptor. B Promedio de los puntos en A junto con diferentes ajustes para la misma.

A pesar de haber E_{app} en esta última combinación (Figura 38), el valor obtenido para este grupo es menor en comparación con los experimentos anteriores, teniendo en la mayoría valores negativos o cercanos a cero. Lo que se puede observar también es el hecho que el ajuste que mejor se adecua a los datos sigue siendo el de dímero incluso en el control negativo. Estos resultados apoyan a los datos obtenidos en los grupos experimentales, en los cuales al parecer el C-terminal no es determinante para que se dé la interacción entre subunidades.

8. Discusión

8.1 Características generales de la secuencia AmHv1

Se han descrito diferentes modelos que intentan explicar el transporte de iones que están implicados en la calcificación de corales, sin embargo, no se había podido identificar experimentalmente la existencia de alguna proteína que pudiera estar implicada particularmente en el movimiento de protones durante ese proceso. La identificación y clonación del canal Hv1 en la especie *A. millepora* es un primer acercamiento en el estudio del papel que pudiera tener este canal en el proceso de calcificación en corales.

Como se observa en las figuras 19 y 20 la similitud entre la secuencia de nucleótidos del canal AmHv1 y las Secuencias A y B que se habían reportado previamente es del 99.1%, difiriendo solamente en algunos nucleótidos. Al traducir dichas secuencias y hacer un nuevo alineamiento entre ellas como el que se presenta a continuación se puede apreciar que la similitud entre las tres secuencias se mantiene, solamente difieren dos aminoácidos entre la secuencia B y el canal AmHv1 en las posiciones 203 y 204, sin embargo, es preciso señalar que en la primera posición mencionada los aminoácidos aunque diferentes presentan propiedades similares, mientras que en la siguiente posición son aminoácidos totalmente diferentes.

A) Alineamiento de las secuencia A con el putativo canal AmHv1

```

SecuenciaA      MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHREKLNELL
AmHv1           MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHREKLNELL
*****

SecuenciaA      HGDKIQYAIWVVLVIIDIIIIVIAELVLDLRAGS-----
AmHv1           HGDKIQYAIWVVLVIIDIIIIVIAELVLDLRAGSEHHDNSASHVLHYISIAILSVFMIELLL
*****

SecuenciaA      -----
AmHv1           KIYAMGFTFFKHKMEVFDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVS LIVLLRLWRVTRIVNGI

SecuenciaA      -----
AmHv1           ILSVQMRAEKKVQAVMKENAELQKELEQLKSKCAQLESELTTLKQS

```

B) Alineamiento de la secuencia B con el putativo canal AmHv1

```

SecuenciaB      -----
AmHv1           MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHREKLNELL

SecuenciaB      -----
AmHv1           HGDKIQYAIWVVLVIIDIIIIVIAELVLDLRAGSEHHDNSASHVLHYISIAILSVFMIELLL

SecuenciaB      ----MGFTFFKHKMEVFDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVS LIVLLRLWRVTRIVNGI
AmHv1           KIYAMGFTFFKHKMEVFDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVS LIVLLRLWRVTRIVNGI
*****

SecuenciaB      ILSVQMRAEKKVQAVMKENAELKAELEQLKSKCAQLESELTTLKQS
AmHv1           ILSVQMRAEKKVQAVMKENAELQKELEQLKSKCAQLESELTTLKQS
*****;*****

```

Figura 39. Alineamiento de las secuencias A y B con el canal AmHv1. A) Corresponde al alineamiento entre la secuencia A y el canal AmHv1 y B) Es el alineamiento entre la secuencia B y el canal AmHv1. Los aminoácidos que son 100% idénticos son representados con un asterisco (*), mientras que los aminoácidos que tienen dos puntos (:) son los que presentan propiedades similares, por último, los aminoácidos que no tienen ningún signo son completamente diferentes.

Al ver el modelado de este nuevo canal (Figura 21) se puede decir que estas diferencias tanto en nucleótidos como en aminoácidos no parecen afectar su estructura por lo que se puede llegar a pensar que posiblemente se traten de mutaciones silenciosas o variaciones sin importancia.

Comparando la secuencia de residuos de aminoácidos del canal AmHv1 con el canal de humano (Figura 40) se puede observar una clara diferencia entre en

tamaño de ambas secuencias, siendo 273 aminoácidos para el canal hHv1 y 226 aminoácidos para AmHv1. En esta imagen también podemos ver que existen muchos aminoácidos conservados, principalmente en el dominio S4, en donde se observa el sello característico de estos canales activados por voltaje (RxxRxxRxx). Cabe mencionar que las regiones donde se encuentra la mayor diferencia son en los dominios amino y carboxilo terminal. Finalmente, es importante resaltar que, a pesar que a nivel de aminoácidos ambas secuencias muestran varias similitudes, a nivel de nucleótidos son muy diferentes.

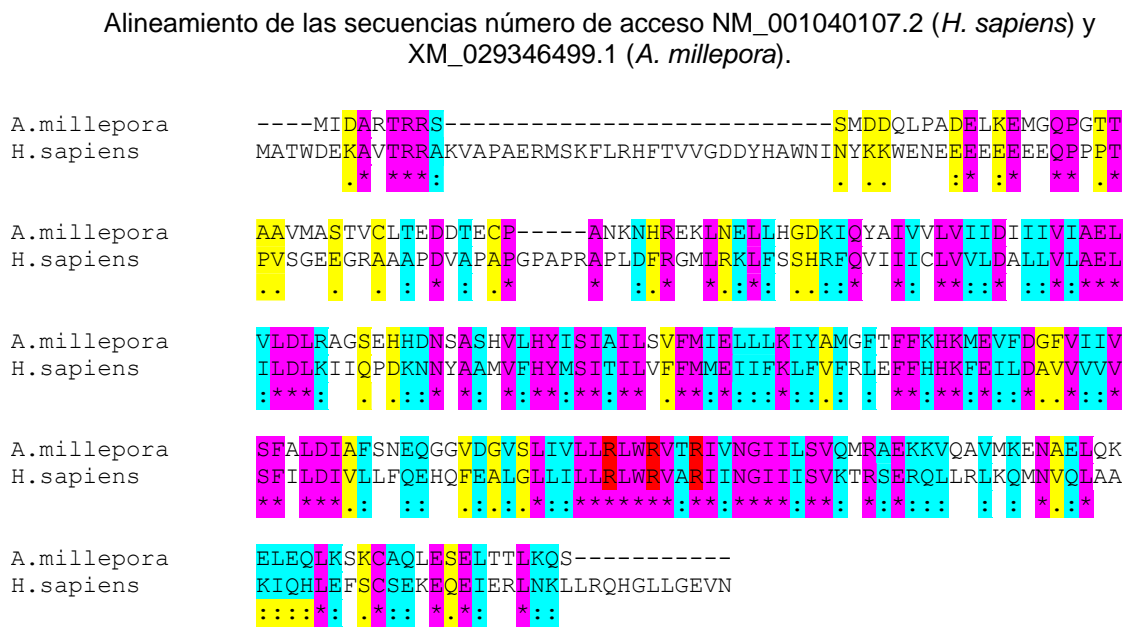


Figura 39. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de AmHv1 y hHv1. Se muestran las secuencias de aminoácidos (aa) del canal Hv1 de las especies *Acropora millepora* y *Homo sapiens*. Los aminoácidos en lila con un * son aquellos que se conservan al 100% en ambas secuencias, en azul con : los aminoácidos que se conservan fuertemente y tienen propiedades similares, en amarillo los aminoácidos que se conservan débilmente y en rojo se muestran las Argininas conservadas del sensor de voltaje de ambos canales.

8.2 Electrofisiología de AmHv1

Respecto a su estructura, el nuevo canal AmHv1 no parece ser muy diferente a lo reportado para mamíferos (Figura 21), lo que sugiere que a nivel funcional

puede ser muy parecido a lo ya descrito para el Hv1 de otras especies. De hecho, de acuerdo con los resultados obtenidos por Cecilia Cervantes Cano, quien también participó en la clonación y caracterización electrofisiológica de dicho canal, podemos decir que funcionalmente se trata efectivamente de un canal selectivo a protones, activado por voltaje, modulado por delta pH e inhibido por Zinc. Así mismo, se encontraron algunas características exclusivas de este canal como su cinética de activación, entre otras. Ahora bien, el presente trabajo se centró puntualmente en determinar si el nuevo canal AmHv1 se expresa como dímero y en aportar información sobre el papel del C-terminal en la estequiometría del canal. Es importante comentar que todos los resultados obtenidos durante la clonación y caracterización del nuevo canal AmHv1 ya han sido publicados recientemente por nuestro grupo de trabajo (Rangel-Yescas *et al.*, 2021).

A través de diferentes experimentos en el canal Hv1 de humano (Tombola *et al.*, 2008), ratón, urocordado (Koch *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010) y cocolitóforo (Taylor *et al.*, 2011) se ha reportado evidencia suficiente para demostrar que el canal Hv1 trabaja normalmente como un dímero al menos en estas especies. Sin embargo, como contraparte, se tienen evidencias que en otros organismos como dinoflagelados (Smith *et al.*, 2011) y diatomeas (Taylor *et al.*, 2012) el canal Hv1 se expresa como monómero.

Una de las características que permite discernir entre una configuración dimérica de una monomérica es el comportamiento en su cinética de activación. Se ha reportado que Hv1 al ser dímero presenta una cinética de activación sigmoidea mientras que es exponencial cuando se trata de un monómero (DeCoursey, 2018); por este mismo comportamiento la activación del canal es aproximadamente 5.5 veces más lenta como dímero que como monómero. Estas características han sido atribuidas a la existencia de un “*gating*” cooperativo que se presenta en dichos canales diméricos, además las cargas elementales que tienen (e_0) son 6 y 3 respectivamente, siendo la mitad cuando se trata de un monómero (Smith & DeCoursey, 2018).

A pesar que este trabajo no se enfocó en realizar una caracterización detallada de las propiedades biofísicas de los canales AmHv1 WT y delta C, los datos obtenidos en los registros electrofisiológicos (Figuras 25 y 26) difieren de las características presentadas para las construcciones monoméricas. Las gráficas Conductancia vs Voltaje (G-V) tanto de las construcciones WT como ΔC presentan un comportamiento sigmoideo en su cinética de activación, además las cargas elementales que tienen son 1.12 y 1.97 para el caso de las construcciones WT y 0.87 y 1.14 para las construcciones ΔC . Estas evidencias nos permiten sugerir que la eliminación del C-terminal para este nuevo canal AmHv1 no le confiere propiedades electrofisiológicas al canal trunco diferentes al WT. Dichos datos concuerdan con lo reportado para otros canales delta C (DeCoursey, 2018).

8.3 Fluorescencia y estequiometría del canal AmHv1

Por otra parte, las imágenes obtenidas en microscopia confocal (Figura 24, 25 y 26) junto con los registros electrofisiológicos sugiere que las construcciones se expresan en la membrana plasmática e indican que la eliminación del C terminar no parece afectar ni su distribución ni su función. Además, es importante señalar que la función del canal WT y delta C no se ven afectada por la fusión con las proteínas fluorescentes.

Ahora bien, en los experimentos de FRET, se procuró usar una cantidad de ADN total de 50-100 ng, con la finalidad de evitar una sobreexpresión de los canales en la membrana dando como resultado un falso positivo en la interacción entre las subunidades, y que haya transferencia de energía debido a la cercanía de los mismos y no porque haya una configuración oligomérica entre ellos.

De acuerdo con los resultados mostrados y teniendo las precauciones antes mencionadas, en la gráfica E_{app} vs I_d/I_a de las construcciones WT (Figura 32) se observa que existe FRET entre ellas, además se encontró que el ajuste que mejor

explica el comportamiento del promedio de los datos obtenidos es el ajuste dimérico, por lo cual se puede sugerir que el canal AmHv1 WT se expresa como un dímero, tal como ocurre en el canal de humano, ratón, urocordado y cocolitóforo.

Para el caso de la combinación de las construcciones ΔC (Figura 34), de igual manera hay eficiencia aparente, sin embargo, al observar el ajuste de los datos podemos decir que los resultados obtenidos no se ajustan al 100% a algún tipo de estequiometría en particular, lo que hace pensar que este canal truncado forma multímeros. A pesar de ello, tal como sucede en las construcciones WT, el ajuste que mejor explicación tiene de los datos es el dimérico.

Dado que la eliminación del C-terminal en el canal AmHv1 al parecer no es determinante para la formación de monómeros, nuestros resultados podrían ser explicados con la existencia de otras regiones de interacción entre las subunidades además del C-terminal, las cuales permitan la formación de dímeros. Estos datos concuerdan con lo reportado para otros canales Hv1, donde también se ha sugerido la existencia de una interface dimérica la cual se ha propuesto en estudios con el canal CiHv1 (Mony *et al.*, 2020), en donde existen interacciones entre los segmentos S1-S1, S4-S4 y S1-S4 de cada subunidad. Estas interacciones pueden seguir existiendo aun sin los dominios C-terminales por lo cual es factible pensar que son estas mismas las que de alguna manera generan la dimerización sin el Coiled-coil.

Por otro lado, se llega a observar este mismo efecto en la combinación Cerulean WT-Citrine ΔC (Figura 36), hay eficiencia aparente que sigue siendo mejor explicada por una configuración dimérica, reforzando de esta manera la idea propuesta por Mony y colaboradores, la cual sugiere que existen otras interacciones en la interfaz dimérica que de alguna manera parecen jugar un papel en la estequiometría del canal.

Es importante mencionar que en cada una de las combinaciones (WT-WT, ΔC - ΔC y WT- ΔC) el porcentaje de la eficiencia aparente cambia, indicando que las

posibles interacciones entre los segmentos de cada subunidad varían dependiendo del contexto en el que se encuentren, pero manteniendo de alguna manera una configuración dimérica estable que permite la funcionalidad del canal AmHv1, debido a esto se pudieron obtener registros de corriente de las cuatro construcciones con resultados muy similares entre sí.

Para constatar los datos experimentales obtenidos en los experimentos anteriores, se utilizó como control negativo la construcción ArcLight como donador (Figura 37), debido a que presenta cierto parecido estructural con el VSD del canal Hv1, siendo la única diferencia el no contar con un C-terminal que permita la estructura Coiled-coil (Jin *et al.*, 2012).

Si bien en este último experimento también hay eficiencia aparente, es preciso señalar que la hubo en menor medida (siendo de aproximadamente un 5%) comparado con los demás experimentos, esto posiblemente es explicado por los microdominios lipídicos como las balsas lipídicas o caveolas que suelen secuestrar las proteínas asociadas a las membranas plasmáticas como los canales iónicos, generando agrupaciones dentro de las mismas (Zacharias *et al.*, 2002) y por consiguiente hay transferencia de energía por la cercanía de los canales dentro de las mismas agrupaciones. Así mismo la mayoría de los datos obtenidos en el control negativo (Figura 38) tienen valores cercanos a cero o negativos, explicados por un posible fotoblanqueo del aceptor. A pesar de haber utilizado un aceptor diferente como parte del control negativo y que por ende su valor de R_0 sea diferente al de los demás experimentos, el valor de r entre las combinaciones WT-WT, ΔC - ΔC y WT-ArcLight son similares (58, 54 y 56 respectivamente) validando de esta manera los resultados obtenidos, es decir, que los datos no resultan de algún artefacto, haciendo de esta manera un control negativo aceptable. Otro punto a recalcar es el hecho que inclusive en este último experimento el ajuste que mejor se adapta a los datos es el dimérico.

Los resultados obtenidos en conjunto nos indican que existen otras interacciones además de la estructura Coiled-coil dada por los C-terminales de cada subunidad, las cuales permite la formación de dímeros. Será necesario en un futuro identificar que otras regiones, además del C-terminal, participan en la formación de dímeros en los canales Hv1.

9. Conclusiones

- ❖ Se logró identificar y establecer la existencia del canal Hv1 de *Acropora millepora* (AmHv1), así como clonarlo y expresarlo en un sistema heterólogo
- ❖ La fusión de las proteínas fluorescentes Cerulean y Citrine al canal AmHv1 y AmHv1 Δ C no afecta la funcionalidad de los mismos.
- ❖ Tanto el canal AmHv1 como AmHv1 Δ C trabajan predominantemente como un dímero.
- ❖ La estructura Coiled-coil no es determinante para la dimerización del canal.
- ❖ Es posible que existen otras interacciones entre las subunidades del canal que participan en la dimerización del mismo.

10. Perspectivas

Al demostrar la existencia de un canal de protones en corales, este trabajo abre las puertas a la investigación sobre la importancia de canal Hv1 en estos organismos y de esta manera tener posiblemente un panorama más cercano a la descripción del proceso de calcificación en corales.

Por otra parte, de acuerdo con las evidencias mostradas en este trabajo, el C-terminal y la estructura Coiled-coil no parecen ser determinantes para la formación de dímeros, por tal motivo, será necesario realizar futuras investigaciones que se centren en dilucidar si existen otras interacciones entre las subunidades que participen en la formación de dímeros. Así mismo como un estudio complementario se podría utilizar la técnica de fotoblanqueo para confirmar de otra forma la formación de posibles dímeros con propiedades diferentes al WT de este canal.

11. Referencias

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Waltr P (2015). *Molecular Biology of the Cell*. 6th edition. New York: Garland Science.
- Al-Horani, F. A., Al-Moghrabi, S. M., & De Beer, D. (2003). The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Marine Biology*, 142(3), 419-426.
- Allemand D., Tambutté E., Zoccola D., Tambutté S. (2011). En Dubinsky Z., Stambler (eds). *Coral reefs: An ecosystem in Transition*. New York: Springer
- Arayal P., Sansom M.S.P., Tucker S. (2015). Hydrophobic Gating in Ion Channels. *Journal of Molecular Biology*. 281. 1580-1586.
- Anthony, K. (1999). Coral suspensión feeding on fine particulate matter. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 232, 85:106
- Barish M.E., Baud C. (1984). A voltage-gated hydrogen ion current in the oocyte membrane of the axolotl, *Ambystoma*. *J. Physiol.* 352, 243-263.
- Bezanilla F. (2005). Voltage-gated ion channels. *IEEE transactions on nanobioscience*. 4:1.
- Boonamnaj, P., & Sompornpisut, P. (2018). Insight into the role of the Hv1 C-terminal domain in dimer stabilization. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(3), 1037-1048.
- Bruce G. Kornreich (2007). *The patch clamp technique: Principles and technical considerations*. , 9(1), 25–37. doi:10.1016/j.jvc.2007.02.001
- Bruca R., Brusca G. (2003). *Invertebrates*. 2da edición. Ed. Sinauer Associates. 922pp
- Castillo K., Pupo A., Baez-Nieto D., Contreras G., Morera F., Neely A., Latorre R., Gonzalez G. (2015). Voltage-gated proton (Hv1) channels, a singular voltage sensing domain. *FEBS Letters* 589: 3471–3478.
- Chan N., Connolly S. (2013). Sensitivity of coral calcification to ocean acidification: a meta-analysis. *Global Change Biology*. 19. 282-290

- Chaves G., Derst C., Franzen A., Maschimo Y., Machida R., Musset B. (2016). Identification of an Hv1 voltage-gated proton channel in insects. *FEBS J.*, 283, 1453-1464.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Decleva E., Menegazzi R., Fasolo A., Defendi F., Sebastianutto M., Dri P. (2013). Intracellular shunting of O₂⁻ contributes to charge compensation and preservation of neutrophil respiratory burst in absence of voltage-gated proton channel activity. *Experimental Cell Research*. 309. 1875-1888.
- DeCoursey, T. E., & Cherny, V. V. (1995). Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells. *The Journal of physiology*, 489(2), 299-307.
- DeCoursey TE. 2013 Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the HV family. *Physiol. Rev.* 93, 599– 652. (doi:10.1152/physrev.00011.2012).
- DeCoursey T.E., Morgan D., Musset B., Cherny V. (2016). Insights into the structure and function of Hv1 from a meta-analysis of mutation studies. *J. Gen. Physiol.* 2016 Vol. 148 No. 2 97–118.
- DeCoursey T.E. (2018). Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, Hv1. *J. R. Soc. Interface* 15: 20180108.
- Demaurex N., Grinstein S., Jaconi M., Schlegel W., Lew D.P., Krause K.H. (1993). Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *J. Physiol.* 466. 329-344.
- Dudev, T., Musset, B., Morgan, D., Cherny, V. V., Smith, S. M., Mazmanian, K. & Lim, C. (2015). Selectivity Mechanism of the Voltage-Gated Proton Channel, HV 1. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- Eder C., Fischer H.G., Hadding U. (1995). Properties of Voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 430. 536-533.

- Erez J (1990) On the importance of food sources in coral-reef ecosystems. In: Dubinsky Z (ed) Coral reefs. Elsevier, Amsterdam, pp 411–441.
- Faber WW, Preisig HR (1994) Calcified structures and calcification in protists. *Protoplasma* 181:78–105
- Fanjul, M., Hiriart, M. (2009). *Biología funcional de los animales II*. 2 ed. México: Siglo XXI.
- González C, Koch HP, Drum BM, Larsson HP. Strong cooperativity between subunits in voltagegated proton channels. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17:51–56. [PubMed: 20023639]
- Henderson L.M., Chappel J.B., Jones O.T. (1988). Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. Further evidence for the presence of an H⁺ conducting channel. *Biochem. J.* 251. 563-567.
- Hille B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer, Sunderland.
- Hutchings PA, Peyrot-Clausade M, Osnorno A (2005) Influence of land runoff on rates and agents of bioerosion of coral substrates. *Mar Pollut Bull* 51:438–447.
- Jin, L., Han, Z., Platasa, J., Wooltorton, J. R., Cohen, L. B., & Pieribone, V. A. (2012). Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron*, 75(5), 779-785.
- Karp G. (2009). *Biología celular y molecular conceptos básicos*. México: McGraw Hill. 776p.
- Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y, Larsson HP. (2008). Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:9111–9116. [PubMed: 18583477]
- Kurokawa T., Okamura Y. (2014). Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: A study with PEGylation protection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838. 382-387.
- Kornreich BG. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol.* 2007 May;9(1):25-37.

- Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2006(v. 1).
- Lisnhko P.V., Botchkina I.L., Fedorenko A., Kirichik Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel.
- Makinder L., Wheeler G., Schroeder D., Riebesell U., Brownlee. (2010). Molecular mechanisms underlying calcification in Coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*. 27. 585-595.
- Mony, L., Stroebel, D., & Isacoff, E. Y. (2020). Dimer interaction in the Hv1 proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34), 20898-20907.
- Mori H., Sakai H., Morihata H., Kawawaki J., Amano H., Yamano T., Kuno M. (2003). Regulatory mechanisms and physiological relevance of voltage-gated H⁺ channel in murine osteoclasts: phorbol myristate acetate induces cell acidosis and the channel activation. *J. Bone Miner. Res.* 18. 2069-2076.
- Moya, A., Huisman, L., Ball, E. E., Hayward, D. C., Grasso, L. C., Chua, C. Woo, H.N., Gattuso J.P., Foret S. & Miller, D. J. (2012). Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂-driven acidification during the initiation of calcification. *Molecular ecology*, 21(10), 2440-2454.
- Musset B, Smith SM, Rajan S, Cherny VV, Sujai S, Morgan D, DeCoursey TE. Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating. *J Physiol*. 2010; 588:1435–1449. [PubMed: 20231140]
- Nelson D., Cox M. (2015). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th edition.
- Okamura Y., Fujiwara Y., Sakata S. (2015). Gating mechanisms of Voltage-gated proton channels. Department of Integrative Physiology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka 565-0871
- Perilla K., Santacruz A. (2007). Producción sexual de los corales hermatípicos *Eusmilia fastigiata* y *Solenastrea bournonii* (Scleractina: Caryophyllidae-Faviidae) en el área de Santa Marta, Caribe colombiano. Universidad de Bogotá.

- Qiu, F., Rebolledo, S., Gonzalez, C., & Larsson, H. P. (2013). Subunit interactions during cooperative opening of voltage-gated proton channels. *Neuron*, 77(2), 288-298.
- Rangel-Yescas G. E., Cervantes C., Cervantes-Rocha, M. A., Suarez-Delgado E., Banaszak A. T., Maldonado E., Ramsey I.S, Rosenbaum T. & Islas, L. D. (2021). Discovery and characterization of Hv1-type proton channels in reef-building corals. *ELife*. DOI: 10.7554/eLife.69248
- Rodwell V., Bender D., Botham K., Kennelly P., Weil A. (2015). Harper's illustrated biochemistry. México: Mc Grow Hill, 817 pp.
- Ratanayotha A., Kawai T., Higashijima S.I., Okamura Y. (2017). Molecular and functional characterization of the voltage-gated proton channel in zebrafish neutrophils. *Physiol. Rep.* 5, e13345.
- Raybaud V., Tambutté S., Ferrier-Pagès C., Reynaud S., Venn A., Tambutté E., Nival P., Allemand D. (2017). Computing the carbonate chemistry of the coral calcifying medium and its response to ocean acidification. *Journal of theoretical biology.* 424. 26-36
- Richards Z., Delbeek J., Lovell E., Bass D., Aeby G., Reboton C. (2008). *Acropora millepora*. Lista roja de especies amenazadas de la UICN.
- Suárez-Delgado, E., & Islas, L. D. (2020). Patch-Clamp Fluorometry and Its Applications to the Study of Ion Channels. In *Basic Neurobiology Techniques* (pp. 155-183). Humana, New York, NY.
- Taylor A., Chrachri A., Wheeler G., Goddard H., Brownlee C. (2011). A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PLoS Biol* 9(6): e1001085.
- Taylor, A. R., Brownlee, C., & Wheeler, G. L. (2012). Proton channels in algae: reasons to be excited. *Trends in plant science*, 17(11), 675-684.
- Takanishi, C. L., Bykova, E. A., Cheng, W., & Zheng, J. (2006). GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain research*, 1091(1), 132-139.
- Thomas RC, Meech RW. (1982). Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature* 1982;299:826–828

- Tombola F, Ulbrich MH, Isacoff EY. The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron*. 2008; 58:546–556. [PubMed: 18498736]
- Smith S.M, Morgan D., Musset B., Cherny V.V, Place A.R., Hastings J.W., Decoursey T.E. (2011). Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A* 108. 18162-18167.
- Vogel S.S, Thaler, C., & Koushil, S. V. (2006). Fanciful fret. *Scienc'es STKE*, 2006 (331).
- Van der Meer, B. W. (2002). Kappa-squared: from nuisance to new sense. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82(3), 181-196.
- Veitinger, S. (2011). The Patch-Clamp Technique. Obtenido el 24 de febrero de 2021 de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique>
- Von Prahk H., Erhrad H. (1985). Corales y arrecifes coralinos/arrecifes Madrepóricos. Colombia. 295p
- Wang Y., Li S.J., Wu X., Che Y., Li Q. (2012). Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 over-expression in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 13877- 13888.
- Wang Y., Zhang S., Li S.(2013). Zn²⁺ induce apoptosis in human highly metastatic SHG-44 glioma cells, through inhibiting activity of the voltage-gated proton channel Hv1. *Biochemical and Biological Research Communication*. 438. 312-317.
- Wheeler AP (1992) Mechanisms of molluscan shell formation. In: Bonucci E (ed) *Calcification in biological systems*. CRC, Boca Raton, pp 179–216
- Yu Y., Yu Z., Xie M., Wang W., Luo X. (2018). Hv1 proton channel facilitates production of ROS and pro-inflammatory cytokines in microglia and enhances oligodendrocyte progenitor cells damage from oxygen-glucose deprivation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 498. 1-8.

- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., & Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296(5569), 913-916.
- Zhao Q., Zhang Y., Li S. (2014). Interaction of divalent metal with the carboxyl-terminal domain of human voltage-gated proton channel Hv1. *Biometals*. 27. 793-802.