

00377
18



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESION FUNCIONAL DE UN CANAL
DE POTASIO RECTIFICADOR
ENTRANTE**

299002

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CAROLINA SALVADOR HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LEONILA MA. LAURA ESCOBAR PEREZ



MEXICO. D. F.

NOVIEMBRE. 2001

**COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de septiembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna SALVADOR HERNANDEZ CAROLINA con número de cuenta 79402352, número de expediente 3991161, con la tesis titulada: "EXPRESIÓN FUNCIONAL DE UN CANAL DE POTASIO RECTIFICADOR ENTRANTE EN EL SISTEMA DEL BACULOVIRUS", bajo la dirección de la DRA. LAURA ESCOBAR PEREZ.

Presidente:	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Secretario:	Dra. Laura Escobar Pérez
Vocal:	Dr. Karen Manucharyan
Suplente:	Dr. Federico Martínez Montes
Suplente:	Dr. David Naranjo Donoso

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de octubre de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se desarrollo bajo la dirección de:

Dra. Laura Escobar Pérez
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
UNAM

El financiamiento para la realización de este trabajo fue proporcionado por:

DGAPA IN220199

CONACyT 30570M

AGRADECIMIENTOS

AL COMITE TUTORAL:

A la Dra. Laura Escobar Pérez por su enorme y constante apoyo para finalizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez que contribuyó enormemente a la realización de este trabajo

Al Dr. Federico Martínez Montes por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo

AL JURADO ASIGNADO:

Por su paciente revisión

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Dra. Laura Escobar Pérez
Dr. Karen Manucharyan
Dr. Federico Martínez Montes
Dr. David Naranjo Donoso

INDICE

RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCION.....	1
Canales de potasio.....	1
1. Los canales Kir.....	1
2. Propiedades estructurales de los Kir.....	2
3. Clasificación de los Kir.....	3
II. PROTEINAS G.....	6
a) Subunidades α de las proteínas G.....	7
b) El dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G.....	8
III. SUBFAMILIA KIR 3 O GIRK.....	10
3.1 Distribución y función.....	10
3.2 Subunidades de los GIRK.....	11
3.3 Los GIRK son tetrámeros.....	12
3.4 Activación directa por la unión de $G\beta\gamma$	13
3.5 Activación por el Na^+ , el ATP-Mg y el PIP_2	14
IV. CORRIENTES ENDOGENAS EN LOS OVOCITOS.....	16
V. OBJETIVOS.....	18
VI. MATERIAL Y METODOS.....	19
a) Clonación del gene del canal GIRK5 de los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	19
- Reacción de la transcriptasa reversa (RT).....	19
- Reacción de la PCR.....	19
- Subclonación del gene del canal GIRK5 en el vector pBF para la expresión en los ovocitos.....	20
- Reacción de ligación.....	22
- Mini-preparación de DNA por el método de lisis alcalina.....	23
- Maxi-preparación de DNA con las columnas de Qiagen.....	24
- Secuenciación.....	24
b) Subclonación del gene del canal GIRK5 en el vector pBB4 para su expresión en las células Sf21	24

- Purificación de DNA del canal GIRK5 y del vector pBB4.....	25
- Ligación de DNA del canal GIRK5 al vector pBB4.....	27
- Mini-preparación de DNA por el método de lisis alcalina.....	28
- Maxipreparación de DNA con las columnas de Qiagen.....	29
- Secuenciación.....	29
c) Purificación del DNA recombinante en las células de insecto Sf21.....	29
- Cotransfección del DNA viral y del canal GIRK5.....	30
i) formación de los liposomas.....	30
ii) cotransfección.....	30
- Ensayo de placa.....	31
- Amplificación del stock del virus.....	31
- Titulación del virus.....	32
d) Comprobación por PCR de la producción del DNA recombinante del canal GIRK5.....	32
- Reacción de la RT.....	32
- Reacción de la PCR.....	33
e) Registros electrofisiológicos.....	34
- Infección de las células Sf21 con el DNA recombinante del canal GIRK5.....	34
- Condiciones de registro.....	34
- Soluciones de registro.....	35
VII. RESULTADOS.....	37
a) Clonación del gene del canal GIRK5.....	37
- Purificación de la banda de DNAc del canal.....	37
- Secuenciación.....	39
b) Subclonación del DNA del canal GIRK5Δ25 en el vector de expresión para las células de insecto.....	41
c) Purificación del DNA recombinante.....	42
d) Comprobación por PCR de la producción del DNA recombinante del canal GIRK5.....	42
e) Registros electrofisiológicos.....	44

VIII. DISCUSION.....	49
Actividad del gene del canal GIRK5 Δ 25 en los ovocitos.....	49
Actividad del gene del canal GIRK5 Δ 25 en las células de insecto.....	54
IX. CONCLUSIONES.....	56
X. BIBLIOGRAFIA.....	57
XI. APENDICE DE PROTOCOLOS.....	63

RESUMEN

Los canales iónicos forman poros hidrofóbicos que se extienden a través de la membrana celular. Los canales de potasio están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en el reino animal, en levaduras y en bacterias.

En los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, se han identificado una variedad de corrientes endógenas.

En 1996 describieron por primera vez las propiedades de la corriente endógena de potasio que se expresa en los ovocitos.

El objetivo de esta tesis fue el de clonar la corriente endógena de potasio del ovocito y expresarla en el sistema de expresión del baculovirus.

Para la clonación del canal se utilizaron ensayos de RT-PCR. Se diseñaron dos iniciadores uno en el extremo 3' y otro en el extremo 5', basados en la secuencia reportada en 1996.

El baculovirus recombinante del canal se purificó por el método de Invitrogen. El baculovirus se purificó dos veces mediante el ensayo de placa y después se amplificó. Se infectaron células de insecto Sf21 para medir la actividad del canal. El registro de las células se hizo por la técnica de fijación de voltaje(patch clamp) en su modalidad de célula entera (whole cell).

El canal clonado GIRK5 Δ 25 y expresado en el sistema de expresión del baculovirus resultó ser un canal de potasio rectificador entrante y selectivo para potasio. Este canal forma homomultímeros funcionales y su actividad depende de las proteínas G.

I. INTRODUCCION

Canales de potasio

Los movimientos iónicos que se realizan en la membrana celular se llevan a cabo a través de tres grandes grupos de proteínas de membrana, la ATPasa, los transportadores y los canales iónicos. Los canales iónicos forman poros selectivos y presentan una selectividad tanto para aniones o para cationes. En general los canales fluctúan entre estados abiertos o cerrados en respuesta al potencial eléctrico de la membrana celular o a la unión de un ligando específico, para coordinar las señales eléctricas de la célula.

Los canales de potasio están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal, así como en levaduras y bacterias. Los canales de potasio pueden ser regulados por cambios en el potencial de membrana o estados metabólicos de la célula o por transmisores y hormonas (Hille, 1992).

Los canales de potasio constituyen la clase más diversa de los canales iónicos conocidos. Debido a su ubicuidad y diversidad, los canales de potasio han servido de modelo para estudios de la selectividad iónica, la activación e inactivación y la permeabilidad de los canales.

Las corrientes de K^+ estabilizan el potencial de membrana en reposo y participan en la fase de repolarización del potencial de acción en las células excitables.

1. Los canales Kir

La corriente de potasio rectificadora entrante actúa como una válvula, favoreciendo la entrada de iones K^+ al hiperpolarizar la membrana celular y dificultando la salida en la depolarización (Hille, 1992).

La propiedad de rectificación de los canales Kir se debe al bloqueo de la corriente saliente de potasio a través del magnesio (Matsuda, 1988) y por poliaminas citosólicas (Lopatin y col., 1994). Estos canales son bloqueados extracelularmente por sodio, cesio y bario (Kubo y col., 1993b)

Los canales Kir se distinguen por tres características principales:

- 1.- Estos canales se activan en condiciones de hiperpolarización con respecto al potencial de equilibrio para el K^+
- 2.- Establecen el potencial de membrana en reposo y lo mantienen cercano al potencial de equilibrio para el K^+ .
- 3.- Parte de su rectificación parece ser intrínseca y ocurre en menos de 1 mseg.

La activación del canal depende de la concentración de K^+ externa y del potencial de membrana, pero no de la concentración de K^+ interna (Hille, 1992).

El papel fisiológico de los canales Kir es el de modular la excitabilidad y la secreción de K^+ para mantener la homeostasis de K^+ bajo el control de ciertos segundos mensajeros intracelulares. Entre estos mensajeros se encuentran las poliaminas, los nucleótidos, los fosfolípidos, las cinasas, el pH y las proteínas heterotriméricas G (proteínas G; Ruppertsberg, 2000).

El primero en describir la propiedad de rectificación entrante en los canales de K^+ fue Katz en 1949, en el músculo esquelético de la rana. Katz también fue el primero en utilizar el término de rectificación "anómala", para diferenciarla de la rectificación saliente o "normal", que la mayoría de los canales de K^+ presentan. Esta corriente anómala o de rectificación entrante se ha estudiado ampliamente en preparaciones tan diversas como peces (Hagiwara y Takahashi, 1974 y Hagiwara y col., 1976), ovocitos de tunicados (Ohmori, 1978), músculo esquelético (Standen y Stanfield, 1978 y Leech y Stanfield, 1981), músculo cardíaco (Sakman y Trube, 1984; Whaler, 1992 y Matsuda y Sperelakis, 1993) y en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Bauer y col., 1996; Martínez y col., 1999; Salvador y col., 2001 y Hedin y col., 1996)

2. Propiedades estructurales de los Kir

Canales de potasio rectificadores entrantes. Topológicamente hablando, estos canales parecen ser menos complejos que los canales de potasio sensibles a voltaje. Los canales de potasio rectificadores entrantes sólo muestran 2 segmentos transmembranales (M1 y M2) en cada subunidad. La región del poro (H5) se encuentra acotada por M1 y M2 y el grupo amino y carboxilo se

encuentran del lado intracelular (Kubo y col., 1993a), como se muestra en la figura 1.

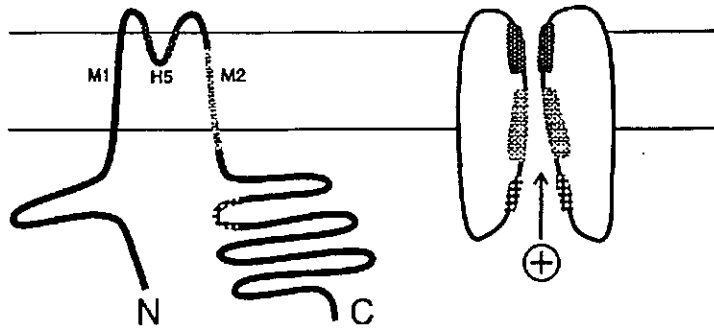


Figura 1. Representación topológica de una subunidad del canal de potasio rectificador entrante. La región del poro H5, los dominios transmembranales M1 y M2. El grupo amino (N) y el grupo carboxilo (C) se encuentran en el citoplasma. Cuatro subunidades dan lugar a la formación de un canal funcional (Jan y Jan, 1997).

Los primeros canales Kir que se clonaron fueron: Kir 1.1 (ROMK1, Ho y col., 1993), KIR 2.1 (IRK1, Kubo y col., 1993a) y Kir 3.1 (Kubo y col., 1993b). Actualmente se han clonado 7 subfamilias de canales Kir (Doupnik y col., 1995), a continuación se describen las características más sobresalientes de estas subfamilias.

3. Clasificación de los Kir

Subfamilia Kir 1

El primer Kir clonado fue el Kir 1.1 (ROMK1) a partir de riñón de rata, donde se expresa predominantemente (Ho y col., 1993). Reportes recientes

indican que también se expresa en varios tejidos cerebrales de manera significativa (Ho y col., 1993; Kenna, 1994 y Boim y col., 1995). Trabajos posteriores han reportado la existencia de isoformas con propiedades funcionales muy similares al Kir 1.1, las cuales se generan mediante el empalme alternativo en la región 5 (Shuck y col., 1994 y Zhou y col., 1994). A diferencia de otras subfamilias Kir, Kir 1.1 presenta una asa de unión a fosfatos en la región carboxilo terminal (Ho y col., 1993). Tal característica apoya la suposición de que la regulación de su activación mediada por ATP implica la fosforilación de la proteína que constituye el canal. De hecho, el trabajo de Xu y col. (1996) demuestra que tales sitios son sustrato para la fosforilación mediada por la proteína cinasa dependiente de cAMP.

Subfamilia Kir 2

Hasta la fecha se han clonado varios miembros de esta subfamilia, que difieren entre ellos en el valor de su conductancia unitaria y en su sensibilidad a la fosforilación por segundos mensajeros (Chang y col., 1996; Fakler y col., 1994 y Henry y col., 1996). Los miembros de la subfamilia Kir 2 se expresan principalmente en el corazón y en el sistema nervioso (Kubo y col., 1993; Perier y col., 1994; Raab-Graham y col., 1994 y Wible y col., 1995).

Subfamilia Kir 3

La subfamilia Kir 3 está formada por canales activados por proteínas G. El primer canal de esta subfamilia se clonó a partir de aurícula de rata, y se expresó en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Dascal y col., 1993). Actualmente existen numerosas evidencias de que en el corazón, en el cerebro y en los tejidos endocrinos, estos canales conducen una corriente que se activa por un receptor acoplado a una proteína G (Ferrer y col., 1995 y Kubo y col., 1993b). Más adelante se muestran las características de esta familia con detalle.

Subfamilia Kir 4 y 5

Dos familias más de canales Kir han sido descritas en el cerebro (Kir 4 y Kir 5; Bond y col., 1994). Cuando en los ovocitos de *Xenopus* se expresa únicamente Kir 4.1, se observa la formación de canales de potasio rectificadores entrantes homotetraméricos, lo cual no sucede con Kir 5.1 (Bond y col., 1994). Estos dos canales pueden coexpresarse en forma heteromultimérica en forma de dímeros o tetrámeros, arreglados de manera específica.

Subfamilia Kir 6

Basados en la homología del Kir 1.1 y de otros miembros de la familia Kir, Inagaki y col. (1995) clonaron el gene uKATP1 (Kir 6.1). Una isoforma específica del páncreas (Kir 6.2) se clonó posteriormente y codifica para una subunidad del canal K_{ATP} (Inagaki y col., 1995). La expresión de los canales funcionales requiere de la coexpresión de Kir 6.2 ó Kir 6.1 (Ammala y col., 1996), con el receptor de sulfonilurea (SUR; Aguilar-Bryan y col., 1995).

Se ha demostrado que el Kir 6.2 forma el poro del canal y la subunidad SUR promueve la afinidad a nucleótidos. Esto sugiere una asociación física entre Kir 6.2 y SUR (McNicholas y col., 1996)

Subfamilia Kir 7

El miembro de esta subfamilia fue clonado en 1998 a partir de una biblioteca de cDNA de cerebro humano (Partiseti y col., 1998). Esta subfamilia presenta el mayor grado de homología en la secuencia de aminoácidos con la subfamilia Kir1.

La subfamilia Kir 7 es la primera que presenta un residuo de metionina en la posición 125 (Met-125) en la región del poro. En esta posición todos los canales Kir conocidos hasta hoy presentan una arginina. A esta arginina se le ha relacionado con la selectividad iónica y el paso de iones por el poro del canal (Jan y Jan, 1997).

Se comprobó que la Met-125 en esa posición es real y no debida a una mutación, por otras secuencias de hipocampo de cerebro humano y el de una

línea celular PC3. La corriente entrante que produce este canal se bloquea por el Cs^{++} y el Ba^{++} .

El RNAm de la subfamilia 7 se encuentra presente en: el cerebro, el riñón, el estómago y el intestino delgado donde se encuentra en niveles elevados.

II. PROTEINAS G

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas de 3 subunidades: α , β y γ . Actualmente se conocen cuatro grupos clasificados con base en la homología de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α (Hamm y Glichrist, 1996 y Nurnberg y col., 1995). Esta subunidad α comparte además homología con miembros de una gran familia de GTPasas que incluyen a las proteínas G de bajo peso molecular como Rho y Ras, además de muchos factores involucrados en la síntesis de proteínas.

El ciclo de activación-inactivación de las proteínas G es crucial para la señal del receptor al efector (Neer, 1995). La subunidad α , cuando tiene GDP unido, permanece asociada con el dímero $\beta\gamma$, formando un heterotrímero inactivo, acoplado al receptor. Cabe destacar que en este estado, la afinidad del receptor acoplado a la proteína G heterotrimérica por su ligando es mayor que en el estado desacoplado (Hamm, 1988 y Vaughan, 1998). El cambio conformacional sufrido por un receptor activo modifica la afinidad de la subunidad α por el GDP. En esta situación, el GDP es reemplazado por GTP, la subunidad α asume su conformación activa y se disocia del receptor y del dímero $\beta\gamma$ (Birnbaumer y Birnbaumer, 1995). El estado activo de la subunidad α permanece hasta que ésta hidroliza al GTP, quedando asociada con el GDP.

La velocidad de hidrólisis del GTP varía sustancialmente de un subtipo de subunidades α a otro (Carty, 1990 y Linder, 1990). Una vez que el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad α se reasocia con el dímero $\beta\gamma$ y se une nuevamente al receptor, quedando el sistema listo para responder a otro estímulo. De tal manera que la hidrólisis del GTP es a su vez un mecanismo que controla la duración de la activación de las subunidades α y del dímero $\beta\gamma$.

Recientemente se ha descrito un grupo de proteínas reguladoras de la actividad de GTPasa de la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (**RGS**). La importancia de este grupo radica en que aceleran la velocidad intrínseca de GTPasa y acortan la vida media del estado activo de la subunidad α , modulando el ciclo de las proteínas G en forma independiente del receptor (Keren-Raifman y col., 2001).

La subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ disociados modulan la actividad de sistemas efectores específicos como: la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, la fosfodiesterasa y ciertos canales de calcio y de potasio (Birnbaumer, 1992; Clapham y Neer, 1993 y Neer, 1995). La actividad de estas enzimas efectoras y de los canales iónicos, regula la concentración celular de los segundos mensajeros responsables de desencadenar respuestas celulares.

a) Subunidades α de las proteínas G:

Inicialmente, la clasificación de las proteínas G se basó en la regulación de la adenilato ciclasa; Gs estimula, Gi inhibe y Go no tiene efecto sobre esta enzima (Katada y col., 1987). Hoy en día se conocen 23 subunidades α diferentes que se han dividido en 4 familias: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$. Las subunidades α , codificadas por 17 genes diferentes (Kehlenbach y col., 1994 y Nurnberg y col., 1995), son proteínas con un peso molecular que va de 39 a 52 kDa y comparten entre 45 y un 85% de homología en su secuencia de aminoácidos. Algunos tipos de subunidades $G\alpha$, particularmente $G\alpha_i$ se miristoilan en una glicina cercana al amino terminal. La asociación a la membrana de la subunidad $G\alpha$ depende de modificaciones postraduccionales tales como la miristoilación y la palmitoilación, así como de su asociación con el dímero $\beta\gamma$, cuya subunidad γ tiene incorporado un grupo isoprenilo insertado en la membrana. La miristoilación es una modificación irreversible, en tanto que la palmitoilación es reversible. Algunas subunidades $G\alpha$ pueden sufrir una o ambas modificaciones, este hecho a llevado a postular que la incorporación de estos grupos regula el grado de asociación a la membrana y por ende la actividad de las proteínas G, particularmente de la subunidad $G\alpha$ (Milligan y col., 1995). Las subunidades α están compuestas de dos

dominios principales: el dominio de GTPasa que incluye al sitio de unión de nucleótidos de guanina, el sitio de unión al receptor y el sitio de unión al dímero $\beta\gamma$ y un dominio que puede contribuir, junto con el dominio de la GTPasa, a la unión de los efectores.

b) El dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G:

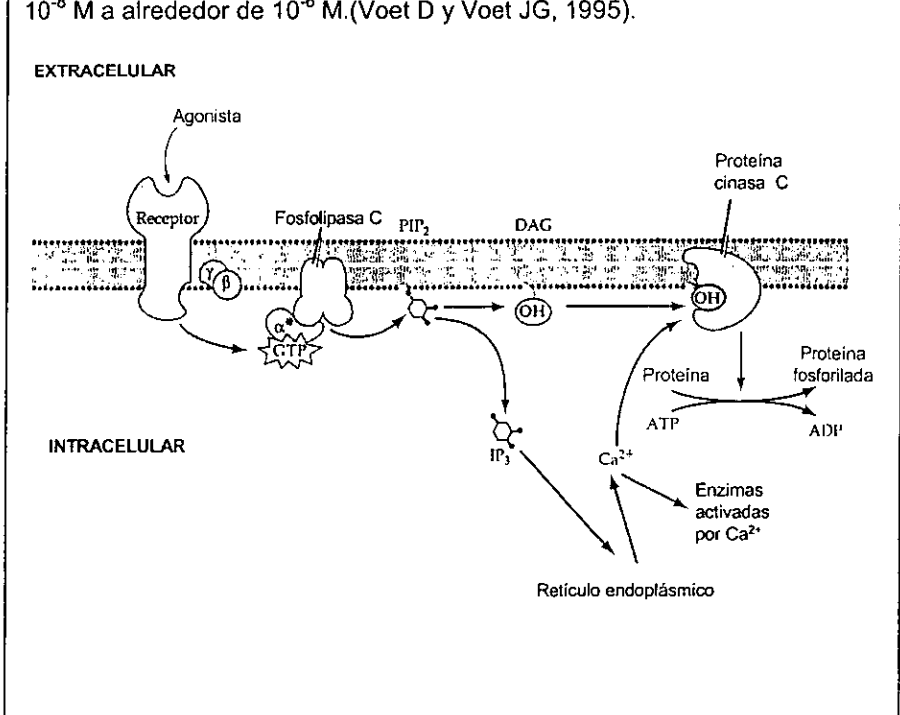
El dímero $\beta\gamma$ es un complejo proteico que debido a la asociación estrecha entre cada una de sus subunidades se considera como una unidad funcional. Sus componentes pueden disociarse solamente bajo condiciones desnaturalizantes *in vitro*. Se han descrito 5 diferentes tipos de subunidades β y 11 de subunidades γ . Los diferentes tipos de subunidades β se caracterizan por tener un grado alto de homología en su secuencia de aminoácidos (del 53 al 90%). El peso molecular de las subunidades β es aproximadamente de 36 kDa. En contraste, las subunidades γ se consideran más diversas entre ellas y comparten solamente un 25% de homología (Neer, 1995; Ray y col., 1995 y Morishita y col., 1995). Las subunidades γ , que tienen un peso de 6-9 kDa, sufren modificaciones postraduccionales tales como isoprenilación y metilación en el carboxilo terminal. Estas modificaciones permiten la interacción adecuada del dímero $\beta\gamma$ con la membrana plasmática y con la subunidad α , a su vez facilitan que la señal se transmita a sus respectivos efectores.

Para tratar de entender cómo la actividad de los canales GIRK se regula por las proteínas G es importante revisar la vía de señalización de los receptores acoplados a las proteínas G que se muestra en el recuadro siguiente:

Vía de señalizaciones de los receptores acoplados a las proteínas G

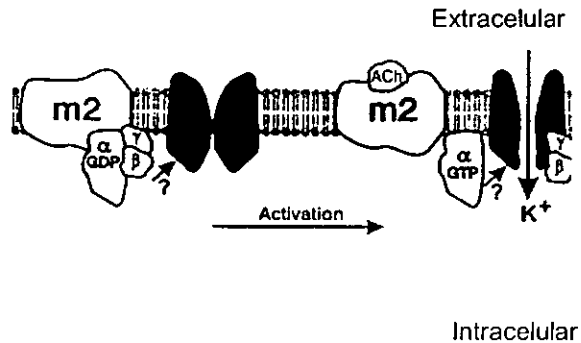
Cuando el agonista se une a su receptor éste activa a la proteína G trimérica ($G\alpha\beta\gamma$) de tal forma que se disocia en $G\alpha$ y en $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ activa a la fosfolipasa C que se encuentra en la membrana plasmática e hidroliza al fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP_2), con la consecuente formación de dos importantes segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3).

El DAG unido a la membrana actúa como segundo mensajero de la proteína cinasa C, una enzima dependiente de Ca^{++} . La proteína cinasa C fosforila residuos de serina o treonina de proteínas específicas. El IP_3 se desplaza por difusión desde la membrana plasmática al retículo endoplásmico, donde se une a receptores específicos y provoca la apertura de canales de Ca^{++} permitiendo así la salida del Ca^{++} almacenado al citosol. La concentración citosólica de Ca^{++} aumenta más de 100 veces, desde estar por debajo de 10^{-8} M a alrededor de 10^{-6} M. (Voet D y Voet JG, 1995).



III. SUBFAMILIA KIR 3 O GIRK

Esta subfamilia de canales se activan por las proteínas G por lo que se les denomina canales **GIRK**. Estos canales se activan mediante mecanismos delimitados a la membrana como se muestra en la figura siguiente:



Mecanismo propuesto para la activación del canal de potasio muscarínico por las proteínas G. Activación del canal GIRK1 después de la estimulación del receptor muscarínico. En reposo, el receptor muscarínico (m2), la proteína G heterotrimérica (Gβγ) y el canal GIRK1 tal vez formen un complejo específico. Si suponemos que el canal de K⁺ está situado cerca del complejo receptor—proteínas G, después de la estimulación del receptor por la acetilcolina (ACh), el canal queda expuesto a una concentración local elevada de Gβγ libres. Lo anterior da como consecuencia la activación rápida del canal. La interacción del canal con la forma activada de GTP-Gα debe de acelerar la actividad de GTPasa de GTP-Gα promoviendo la rápida deactivación hacia el final de la estimulación del receptor (Breitwieser y Szabo, 1988).

3.1 Distribución y función

Los GIRKs tienen un papel fisiológico muy importante. En el corazón en las células del marcapaso, los GIRKs son probablemente los canales de K⁺ más importantes en mantener el potencial de reposo; cualquier cambio en su actividad afecta la excitabilidad y eventualmente el ritmo cardiaco. En el ventrículo prácticamente no se encuentran canales GIRK (Kurachi, 1995)

En la aurícula de mamíferos se ha reportado la presencia de RNA y proteína de las subunidades GIRK1 y GIRK4 pero no se encuentran en el

ventrículo. Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado con los datos electrofisiológicos (Krapivinsky y col., 1995c y Lesage y col., 1995)

Los subtipos de receptores que activan a los canales GIRK vía proteínas G son: el muscarínico (m_2), el γ -ácido aminobutírico (GABA_B), el de serotonina (5HT_{1A}), el de adenosina (P_1), el de somatostatina, el de encefalina (μ, κ, δ), el α 2-adrenérgico y la dopamina (D_2) (Jelacic y col., 2000).

En el páncreas, por ensayos con el RNA, se han encontrado la expresión de los canales GIRK, pero no se sabe la función que tienen ahí (Ferrer y col., 1995).

En el corazón, la corriente típica más estudiada es la $I_{K_{Ach}}$, la cual se forma por el ensamblaje heteromultimérico de GIRK1 y GIRK4. La acetilcolina liberada por el nervio vago se une a receptores muscarínicos, los que a su vez activan a proteínas G intracelulares del tipo Gi/ Go. La subunidad $G\beta\gamma$ activa al heteromultímero GIRK1/ GIRK4, lo cual hace que la célula se hiperpolarice y como consecuencia se disminuye el ritmo cardiaco (Huang y col., 1997, 1998 y Krapivinsky y col., 1998).

3.2 Subunidades de los GIRK

Hasta la fecha se han clonado cinco miembros del grupo GIRK (GIRK1 a 5). Del GIRK1 al GIRK4 fueron clonados de mamífero a partir de varios tejidos de rata, de humano, de ratón, de cerdo y de pollo (Chan y col., 1996a; Dasacal y col., 1993; Kubo y col., 1993a; Lesage y col., 1994 y Spauschus y col., 1996 respectivamente). El número total de aminoácidos de las diferentes subunidades varía entre 393 (GIRK3) y 501 (GIRK1). A partir de los ovocitos de la rana *Xenopus* se clonó el GIRK5 (Hedin y col., 1996). El porcentaje de homología entre los GIRK varía de 60 a 80%. Las regiones de aminoácidos que más varían entre ellos son hacia el amino terminal (los primeros 40 aminoácidos) y hacia el carboxilo terminal (después del aminoácido 360). Es muy probable que estas regiones sean las que determinen las propiedades funcionales específicas de cada subunidad.

3.3 Los GIRK son tetrameros

Los canales GIRK normalmente forman heterotetrameros que dan lugar a la formación de un canal funcional. Estos heterotetrameros se forman por la combinación de 2 subunidades GIRK de un tipo con otras 2 subunidades GIRK de otro tipo; ejemplo: 2 subunidades de GIRK1 y 2 subunidades de GIRK4, en corazón.

La subunidad GIRK1 no produce canales funcionales cuando se expresa en diferentes líneas celulares (Chan y col., 1996b; Philipson y col., 1995 y Velimirovic y col., 1996) con la excepción de ovocitos de *Xenopus* (Dascal y col., 1993 y Kubo y col., 1993b) y la línea celular β TC3 (Philipson y col., 1995), por la presencia de un canal GIRK endógeno.

Hedin y col., mostraron evidencias de que la corriente que se presenta en los ovocitos de *Xenopus* cuando se inyecta GIRK1 esta dada por la formación de heteromultímeros entre GIRK1 y la subunidad endógena de los ovocitos, GIRK5. Probablemente sucede lo mismo con la línea celular β TC3.

La región del poro del canal GIRK1 presenta una fenilalanina en la posición 137 (F137). Cuando se hace una mutación en esta posición por una serina F137S, esto da lugar a la formación de un canal funcional como homomultímero (Chan y col., 1996b). La mutante de GIRK4 S143T también forma homomultímeros funcionales (Vivaudou y col., 1997). Las subunidades de GIRK2 a 5 presentan serina en la posición 137.

Los canales GIRK por lo general forman heteromultímeros de GIRK1 con otra subunidad GIRK, por ejemplo: GIRK1/GIRK4 corriente de K_{Ach} y GIRK1/GIRK2 que es un canal muy abundante en diferentes áreas del cerebro (Kofuji y col., 1995; Kofuji y col., 1996; Laio y col., 1996 y Velimirovic y col., 1996).

GIRK2 presenta 4 isoformas formadas por el empalme alternativo: GIRK2a a GIRK2d (Inanobe y col., 1999). Sólo la isoforma de GIRK2d puede formar homomultímeros funcionales. Esta isoforma presenta un amino terminal más corto, 18 aminoácidos menos, comparado con las otras 3 isoformas.

La isoforma GIRK2a es 11 aminoácidos más corta hacia la región carboxilo terminal.

3.4 Activación directa por la unión de G $\beta\gamma$

Hasta la fecha son varios los reportes que confirman la activación de los canales GIRK por varios subtipos de proteínas G $\beta\gamma$ ya sea purificadas o recombinantes (Kurachi y col., 1995). La activación del canal cardíaco K_{ACh} tiene una K_D aparente entre 4 y 11 nM dada por la combinación de G β_1 o G β_2 con diferentes tipos de G γ (Krapivinsky y col., 1995b y Wickman y col., 1994).

La subunidad GIRK1 al igual que las otras subunidades GIRK no presentan un sitio de unión específico para las proteínas G (G $\beta\gamma$) (Cohen y col., 1995) o una secuencia QXXER específica para la interacción del complejo G $\beta\gamma$ con la adenilato ciclasa (Chen y col., 1995)

Se realizaron estudios con la región del carboxilo terminal de GIRK1 mapeando los diferentes sitios de unión a G $\beta\gamma$. Se encontró que el sitio más probable de unión del canal a estas proteínas, es en la región del carboxilo terminal, de los aminoácidos 290 al 356 (Kunkel y col., 1995) o entre los aminoácidos 273 y 462 (Huang y col., 1995)

Por otra parte se han realizado estudios con quimeras entre el GIRK1 y un canal Kir no modulado por proteínas G (Kir 2.1, Kir 2.2 ó Kir 4.1) expresados en los ovocitos de la rana *Xenopus* para estudiar las regiones de interacción del canal con el complejo G $\beta\gamma$. Los resultados sugieren que tanto el amino como el carboxilo de GIRK1 pueden conferir sensibilidad a las proteínas G en el canal insensible a G $\beta\gamma$, aunque el grupo carboxilo parece ser más eficiente (Kubo y Iizuka, 1996; Kunkel y Peralta, 1995; Slesinger y col., 1995 y Tucker y col., 1996; figura 2).

Inanobe y col., 1995, Kunkel y Peralta, 1995 y Huang y col., 1997, mostraron que tanto el grupo amino como el carboxilo de la subunidad GIRK1 presentan sitios de unión al complejo G $\beta\gamma$. En la región amino, los aminoácidos del 1 al 38 y en la región del carboxilo del aminoácido 434 al 462, están involucrados en esta regulación.

3.5 Activación por el Na⁺, el ATP-Mg y el PIP₂

Los canales de K⁺ GIRK nativos o recombinantes son activados directamente por la subunidad βγ de las proteínas G. La presencia del fosfatidil inositol-bisfosfato (PIP₂) se requiere para la activación de las proteínas G. La formación del PIP₂ endógeno (vía hidrólisis del ATP) o la aplicación de PIP₂ exógeno aumenta el tiempo de apertura de un canal GIRK y lo hace sensible a la apertura por los iones Na⁺ internos (Petit-Jacques y col., 1999).

La actividad de los canales GIRK que se regula por el ATP-PIP₂ también se estimula por el Mg²⁺ intracelular. El Na⁺ y el Mg²⁺ producen efectos independientes uno del otro o de la activación del canal por la subunidad Gβγ.

En niveles altos de PIP₂ la interacción combinada del Na⁺, del Mg²⁺ y de la subunidad Gβγ da como resultado un aumento en la actividad del canal de varias órdenes de magnitud.

Los canales GIRK se activan independientemente por la Gβγ o el Na⁺ interno por una vía de mecanismos que requieren de los fosfatos de fosfatidil-inositol. La activación de los canales GIRK por la Gβγ parece involucrar un incremento substancial en las interacciones de PIP₂-canal (Huang y col., 1998 y Sui y col., 1998).

Los arreglos conformacionales que se inducen por la unión de Gβγ en los canales GIRK se desconocen. Una cisteína muy cercana al sitio de unión del PIP₂ en el canal GIRK4 parece ser importante para la activación dependiente de Gβγ de los canales que forman heteromultímeros de GIRK1-GIRK4 (Krapivinsky y col., 1998). En los canales heteromultiméricos de GIRK1-GIRK2, el aspartato en la posición 226 del canal GIRK2 es crucial para la activación dependiente de Na⁺. Este ión interactúa directamente con el aspartato para así reducir el potencial electrostático negativo y promover la interacción funcional de los canales con PIP₂. Se identificó el Asp 226 también en los canales GIRK2 homomultímeros (Ho y Murrell-Lagnado, 1999). El canal GIRK4 también posee un aspartato en la posición equivalente, mientras que el canal GIRK1 tiene una asparagina (Asn 217). Este parece ser parte del mecanismo por el cual la actividad del canal se incrementa independientemente de las proteínas G.

En la figura 2 se muestra esquemáticamente las regiones identificadas hasta la fecha en la interacción de los canales GIRK con las proteínas G, el PIP₂ y el Na⁺.

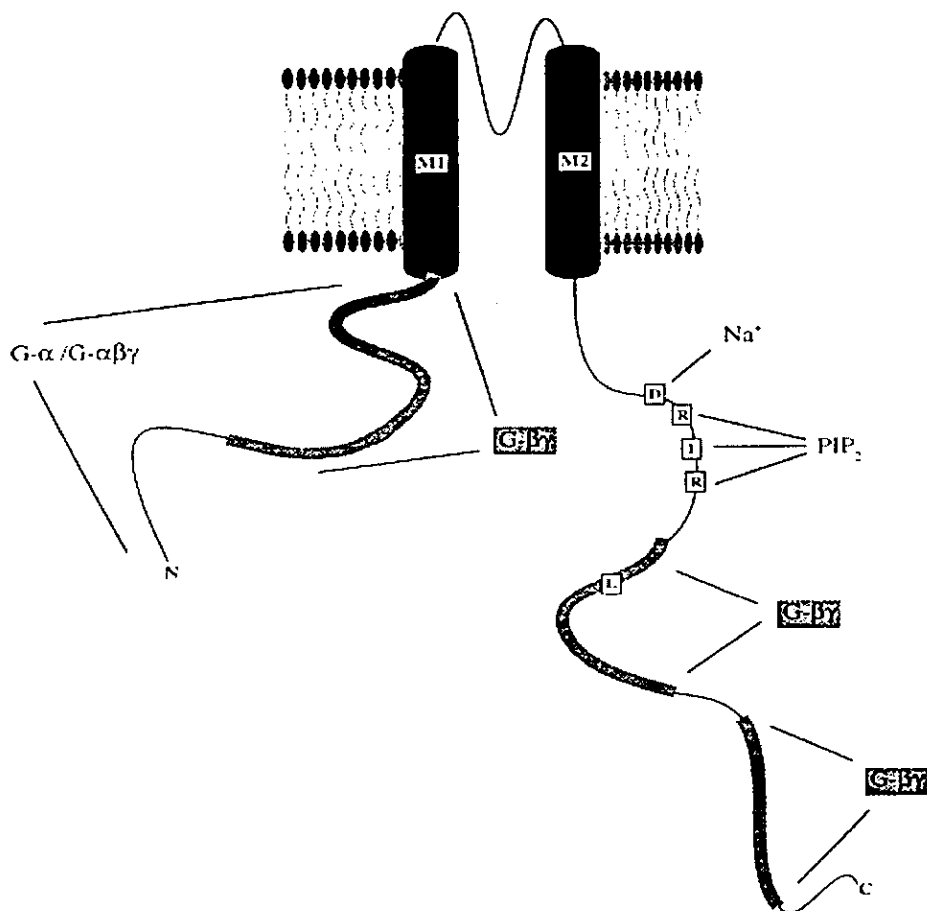


Figura 2. Representación esquemática de las regiones identificadas en los canales GIRK que interactúan con: las proteínas G, el PIP₂, y el Na⁺. Los sitios de unión a las proteínas G tanto en el amino como en el carboxilo terminal del canal GIRK (Huang y col., 1995, 1997). La mutación puntual en el carboxilo terminal de leucina (L) a glutamato (E) disminuye la unión a las Gβγ (He y col., 1999). Se sugiere que el Na⁺ neutraliza las cargas negativas del aspartato (D) en la región del carboxilo terminal, esto permite la unión más fuerte del PIP₂. La interacción del PIP₂ con el canal esta determinada por dos residuos de arginina (R) cargados positivamente y la isoleucina (I) que es un aminoácido hidrofóbico (Logothetis y Zhang, 1999; Ho-Murrell-Lagnado, 1999 y Zhang y col., 1999).

IV. CORRIENTES ENDOGENAS EN LOS OVOCITOS

Los ovocitos de la rana de Xenopus laevis es un sistema de expresión heteróloga ampliamente utilizado en el estudio de las propiedades de los canales iónicos y de los receptores. Hasta ahora se han identificado una variedad de corrientes endógenas en los ovocitos desfoliculados: una corriente de cloro activada por calcio (Miledi, 1982), canales de calcio (Dascal y col., 1986), y de potasio dependientes de voltaje (Lu y col., 1990) y canales activados por presión (Yang y Sachs, 1990). Con menos frecuencia se expresan en el ovocito otras corrientes como son: una corriente de cloro no dependiente de calcio (Parker y Miledi, 1988), una corriente de sodio (Parker y Miledi, 1987b), una corriente de potasio saliente que se inactiva lentamente (Parker y Ivorra, 1990) y una corriente rectificadora entrante de potasio (Bauer y col., 1996).

Varios autores (Bauer y col., 1996; Martínez y col., 1999 y Salvador y col., 2001) describieron las propiedades de una corriente entrante de K^+ endógena que se expresa en los ovocitos de la rana de Xenopus laevis, y caracterizaron su dependencia al voltaje de activación y de inactivación y propiedades farmacológicas. Esta corriente se activa en condiciones hiperpolarizantes con un potencial de mantenimiento de -20 mV, en una solución externa de alto K^+ (90 mM). Cuando se aumenta la concentración de K^+ externa, la amplitud de la corriente aumenta y el potencial de inversión cambia hacia potenciales más positivos. Esta corriente se bloquea parcialmente por Ba^{++} y Cs^+ (5mM) y TEA (50mM) mientras que 4-aminopiridina (10mM) no tiene efecto.

Hedin y col., 1996, reportaron que cuando se expresa en los ovocitos de Xenopus el GIRK1 en ausencia del GIRK4, la corriente resultante es menor en un 80% que cuando se coexpresan ambas proteínas. Si GIRK1 no es capaz de formar canales homomultiméricos, entonces los canales observados en ausencia de GIRK4 pueden resultar de la combinación de GIRK1 con una proteína endógena de los ovocitos que sea capaz de sustituir a GIRK4. Esa posibilidad se ha confirmado y la proteína endógena del ovocito se ha denominado Xir (Hedin y col., 1996).

Xir se considera como un nuevo miembro de la subfamilia Kir 3 el cual se ha clasificado como Kir 3.5 (GIRK5). El GIRK5 tiene un tamaño de 1.5 Kb y codifica para una proteína de 45 kDa con 404 aminoácidos en total. Este canal posee tres sitios probables de iniciación de ATG , siendo el codón en la posición 186 el sitio más probable.

La secuencia de GIRK5 y GIRK4 muestran una homología del 74.9 % a nivel de aminoácidos. Los ovocitos que expresan GIRK5 en ausencia de GIRK1 muestran una corriente sensible a acetilcolina. Por otro lado, Hedin y col. (1996) mostraron que en los ovocitos de *Xenopus* GIRK4 y GIRK5 pueden participar juntos en la formación de canales de potasio acoplados a proteínas G.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

**EXPRESAR FUNCIONALMENTE EL CANAL DE POTASIO RECTIFICADOR
ENTRANTE GIRK5 EN EL SISTEMA DEL BACULOVIRUS**

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Subclonar el gen del canal GIRK5 en un vector para células de insecto.
- 2.- Detectar la expresión del canal en las células de insecto (RT-PCR).
- 3.- Registrar las corrientes entrantes del canal por el método de patch clamp.
- 4.- Estudiar la regulación del canal por el GTP γ S.

VI. MATERIAL Y METODOS

a) Clonación del gene del canal GIRK5 de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*

Se preparó RNA total a partir de 0.8 g de ovocitos desfolículos por el método de cloruro de cesio (Sambrook y col., 1989).

Reacción de la transcriptasa reversa (RT)

Se tomaron 5 µg de RNA total en 10 µl de volumen final en agua.

Se incubó a 65 °C por 10 min.

Se enfrió a 4 °C por 5 min.

Para la reacción de la RT a este RNA se le agregó lo siguiente:

4 µl de buffer 5X de RT

2 µl de dNTP's 10 mM (SIGMA)

2 µl de DTT 0.1M (GIBCO)

1 µl de hexámeros = 100 pmoles

1 µl de enzima RT GIBCO (200 U/ µl)

Se incubó a 37 °C por 1 hr y a 95 °C por 5 min.

Se agregaron 20 µl de agua (grado Biología Molecular) para dar un volumen final de reacción de 40 µl.

Se guardó esta reacción de RT a 4 °C y se utilizó durante una semana en las reacciones de PCR (reacción de la polimerasa en cadena).

Reacción de la PCR

Se diseñaron dos iniciadores basados en la secuencia de aminoácidos por homología con el GIRK4. La secuencia de estos iniciadores (GIBCO) fue:

Iniciador sentido: (5' a 3') CAT CGT CGA CAT GGC AAG GGA TTT AAG GGT
CTC TAT G. Con el sitio de restricción de Sal I en la región 5'

Iniciador antisentido: (5' a 3') GAA ATG TAT CAA TGT TTT TCT GCA GTC AGT
CTG GCT GTG. Con el sitio de restricción de Pst I en la región 3'

- 34 μ l de agua BM (grado Biología Molecular)
- 5 μ l de buffer 10X para la enzima Taq polimerasa (GIBCO)
- 1.5 μ l de cloruro de magnesio 50 mM
- 1 μ l de dNTP's 10 mM (SIGMA)
- 2 μ l de iniciador sentido 10 μ M
- 2 μ l de iniciador antisentido 10 μ M
- 0.5 μ l de Taq polimerasa GIBCO (5U/ μ l)
- 4 μ l de cDNA de la reacción de RT
- 50 μ l volumen final de la reacción de PCR

La reacción de PCR se hizo en un termociclador 2400 (Perkin Elmer). Se utilizó el programa siguiente:

1. 94 °C 5 min.
 2. 94 °C 1 min.
 3. 54 °C 1 min.
 4. 72 °C 1 min. y 30 seg.
 5. 72 °C 10 min.
 6. 4 °C
- del inciso 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos.

Se utilizaron 10 μ l de la reacción de PCR para identificar las bandas amplificadas en un gel de agarosa (ver apéndice).

Por peso se identificó la banda que correspondía al canal GIRK5. Se corrieron 80 μ l de la reacción de PCR para purificar la banda del canal a partir del gel de

agarosa (ver apéndice). Posteriormente, se digirió con las enzimas de restricción Sal I y PstI en la reacción siguiente:

- 5 μ l del buffer No. 2 10X (GIBCO)
- 44 μ l del fragmento purificado
- 1.5 μ l de la enzima de restricción Sal I 10 U/ μ l (GIBCO)
- 1.5 μ l de la enzima de restricción Pst I 10 U/ μ l (GIBCO)
- 52 μ l volumen final de la reacción (por duplicado)

Se incubó a 37 °C por 2 hr

Se agregaron 6 μ l de buffer de corrida para DNA.

Se corrió la digestión en un gel de agarosa (12 μ l digestión/carril).

Se purificaron las bandas de DNA a partir del gel de agarosa con el kit "concert gel extraction system" (GIBCO).

Al final se obtuvieron 50 μ l de DNA del canal ya purificado y se corrieron 5 μ l de este en un gel de agarosa para cuantificar la cantidad del DNA presente.

Subclonación del gene del canal GIRK5 en el vector pBF para la expresión en los ovocitos

La banda se subclonó en los sitios de restricción de las enzimas Sal I y Pst I del vector pRSSP6013A3-UWE (pBF), para su expresión en ovocitos. Se hizo la reacción siguiente:

- 24.5 μ l de agua BM
- 3.5 μ l del buffer No. 2 10X (GIBCO)
- 4 μ l de DNA del vector (2 μ g)
- 1.5 μ l de la enzima de restricción Sal I (GIBCO)
- 1.5 μ l de la enzima de restricción Pst I (GIBCO)
- 30 μ l volumen final de la reacción (por duplicado)
- 35 μ l volumen final de reacción

Se incubó la reacción a 37 °C por 2 hr

Se purificó el vector a partir del gel de agarosa (ver apéndice).

Para evitar que el vector se volviera a recircularizar se llevó a cabo la reacción de desfosforilación siguiente:

27 μ l del vector purificado

3 μ l del buffer 10X para la enzima

1 μ l de la enzima fosfatasa alcalina 1U/ μ l (New England Biolab)

31 μ l volumen final de reacción (por duplicado)

Se incubó a 37 °C por 1 hr

Se agregaron 6 μ l de buffer de corrida para DNA.

Se corrió la digestión en un gel de agarosa (12 μ l digestión/carril).

Se purificaron las bandas de DNA a partir del gel de agarosa con el kit "concert gel extraction system" (GIBCO).

Al final se obtuvieron 50 μ l de DNA del vector ya purificado y se corrieron 5 μ l de éste en un gel de agarosa para cuantificar la cantidad de DNA presente.

Reacción de ligación

Una vez que se obtuvo el DNA del canal y del vector (cortados con las enzimas de restricción adecuadas) se procedió a ligarlos. Esta reacción de unir DNA lo lleva a cabo la enzima T4 DNA Ligasa en la reacción siguiente:

2.5 μ l buffer para la enzima 10X

2.5 μ l ATP 10 mM

1 μ l enzima de ligación T4 DNA Ligasa (1 U/ μ l) (Roche)

Diferentes proporciones de DNA del vector y del canal: 1:1, 1:3 y 1:6

Una cantidad de agua BM variable para completar una reacción de ligación final de 25 μ l.

Se incubó la ligación toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se llevó a cabo la transformación de estas reacciones de ligación en células competentes.

La transformación con las células competentes DH5 α se hizo como se describe en el apéndice.

Al final se plaquearon las cajas de agar con medio LB para las reacciones de ligación y para los controles necesarios.

Se incubaron las cajas a 37 °C toda la noche.

Se contó el número de colonias de bacterias que crecieron en cada caja.

Se seleccionaron 4 colonias individuales transformadas con el gene del canal y se crecieron cada una en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml.

Se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación.

Minipreparación de DNA por el método de lisis alcalina

Se hizo la preparación de DNA con los cultivos bacterianos, por el método de lisis alcalina (ver apéndice).

Al final se obtuvieron 40 μ l de DNA para cada colonia y se corrió 1 μ l en un gel de agarosa.

Por otra parte se utilizó 1 μ l de este DNA para hacer una digestión con las enzimas de restricción adecuadas, para ver que el gene del canal GIRK5 se hubiera insertado en el vector.

La reacción fue la siguiente:

9 μ l de agua grado BM

2 μ l del buffer 10X del No. 2 (GIBCO)

1.5 μ l de DNA de cada colonia

1 μ l de la enzima Pst I 10 U/ μ l (GIBCO)

1 μ l de la enzima Sal I 10 U/ μ l (GIBCO)

1 μ l de la enzima RNasa 10 mg/ml

15.5 μ l volumen final de reacción

Se hicieron varios ensayos con diferentes enzimas de restricción para saber si el gene del canal se encontraba insertado en el vector en sentido o en atisentido. La reacción fue la siguiente:

14.5 μ l de agua grado BM
2 μ l del buffer 10X correspondiente
0.5 μ l de DNA de cada colonia
1-2 μ l de la enzima correspondiente 10 U/ μ l (GIBCO)
1 μ l de la enzima RNasa 10 mg/ml
20 μ l volumen final de reacción

Se incubó a 37 °C 1.5 hr

Se corrieron las digestiones en un gel de agarosa (ver apéndice).

Maxipreparación de DNA con las columnas de Qiagen

Una vez que se encontró el DNA de la colonia que contenía insertado el gene del canal en la dirección correcta, se escogió esta colonia para preparar una mayor cantidad de DNA. Al final se obtuvieron 800 μ l de DNA a una concentración de 0.6 μ g/ μ l para dar un total de 490 μ g.

Esta preparación se hizo con el kit Qiagen (Plasmid Maxi Kit 25) (ver apéndice).

Secuenciación

Con este DNA y con los iniciadores sentido y antisentido se mando a secuenciar el canal por el método automatizado (AB1 Prism 310, Perkin Elmer).

b) Subclonación del gene del canal GIRK5 en el vector pBB4 para su expresión en células Sf21

El DNA del canal GIRK5 se encontraba clonado en el vector pBF para su expresión en ovocitos de la rana de *Xenopus laevis*. El primer paso en la

realización de este trabajo fue el de subclonar el canal en el vector pBB4 para la expresión en células de insecto Sf21.

Purificación de DNA del canal GIRK5 y del vector pBB4

Todos los geles de agarosa que se utilizaron en esta parte del proyecto fueron al 1 % en TBE 1X (ver apéndice).

i) El DNA del canal se encontraba acotado por los sitios de restricción de Sal I en el extremo 5' y de Pst I en el extremo 3'. Se hizo la digestión de 2 µg de DNA del canal para poder liberarlo en la reacción siguiente:

- 20 µl de agua grado BM
- 3 µl del buffer No. 2 10X (GIBCO)
- 3.5 µl de DNA GIRK5 (0.6 µg/µl)
- 1.5 µl de la enzima de restricción Sal I 10 U/µl (GIBCO)
- 1.5 µl de la enzima de restricción Pst I 10 U/µl (GIBCO)
- 30 µl volumen final de la reacción (por duplicado)

Se incubó a 37 °C por 2 hr

Se agregaron 6 µl de buffer de corrida para DNA.

Se corrió la digestión en un gel de agarosa (12 µl digestión/carril).

Se purificaron las bandas de DNA a partir del gel de agarosa con el kit "concert gel extraction system" (GIBCO).

Al final se obtuvieron 50 µl de DNA del canal ya purificado y se corrieron 5 µl de este en un gel de agarosa para cuantificar la cantidad de DNA presente.

ii) Para poder ligar el DNA del canal con el vector pBB4 se digirió a este en el extremo 5' con la enzima de restricción Xho I que presenta extremos cohesivos con la enzima Sal I del canal. Por el extremo 3' se digirió al vector con la misma enzima Pst I que ya se había digerido el DNA del canal. De tal modo que la ligación fue en el extremo 5' Sal I / Xho I y en el extremo 3' Pst I / Pst I canal y

vector respectivamente. Se hizo la digestión de 2 μg de DNA del vector pBB4 en la reacción siguiente:

- 20.5 μl de agua grado BM
- 3 μl del buffer No. 2 10X (GIBCO)
- 3.5 μl de DNA del vector (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 1.5 μl de la enzima de restricción Xho I (GIBCO)
- 1.5 μl de la enzima de restricción Pst I (GIBCO)
- 30 μl volumen final de la reacción (por duplicado)

Se hicieron los controles para verificar la actividad de cada enzima de restricción por separado en la reacción siguiente:

- 7 μl de agua grado BM
- 1 μl del buffer No. 2 10X (GIBCO)
- 1 μl de DNA del vector
- 1 μl de la enzima de restricción Xho I (GIBCO)
- 10 μl volumen final de la reacción

Se hizo la misma reacción pero con la enzima de restricción Pst I.

Se incubaron las reacciones a 37 °C por 2 hr

Se inactivó la actividad de las enzimas por temperatura a 65 °C por 15 min.

A las reacciones de digestión sencillas se les agregaron 2 μl de buffer de corrida para DNA y se corrieron en un gel de agarosa.

Para evitar que el DNA del vector se volviera a recircularizar se llevó a cabo la reacción de desfosforilación. En la reacción doble de ligación se le agregaron 2 μl de la enzima fosfatasa alcalina 1 U/ μl (New England Biolab).

Se incubó a 37 °C por 30 min.

Se agregaron otros 2 μl de la enzima Fosfatasa alcalina.

Se incubó a 37 °C por otros 30 min.

Se agregaron 6 μ l de buffer de corrida para DNA.

Se corrió la digestión en un gel de agarosa (12 μ l digestión/carril).

Se purificaron las bandas de DNA a partir del gel de agarosa con el kit "concert gel extraction system" (GIBCO).

Al final se obtuvieron 50 μ l de DNA del vector ya purificado y se corrieron 5 μ l de este en un gel de agarosa para cuantificar la cantidad de DNA presente.

Ligación de DNA del canal GIRK5 al vector pBB4

El DNA purificado del canal y del vector se ligaron en la reacción siguiente:

2.5 μ l buffer para la enzima 10X

2.5 μ l ATP 10 mM

1 μ l enzima de ligación T4 DNA Ligasa (1 U/ μ l) (Roche)

Diferentes proporciones del DNA del vector y del canal: 1:1, 1:3 y 1:4

Una cantidad de agua variable BM, para completar una reacción de ligación final de 25 μ l.

Se incubó la ligación toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se llevó a cabo la transformación de estas reacciones de ligación en células competentes.

La transformación con las células competentes DH5 α se hizo como se describe en el apéndice.

Al final se plaquearon las cajas de agar con medio LB para las reacciones de ligación y para los controles necesarios.

Se incubaron las cajas a 37 °C toda la noche.

Se contó el número de colonias de bacterias que crecieron en cada caja.

Se seleccionaron 9 colonias individuales transformadas con el DNA del canal y se crecieron cada una en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml

Se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación.

Al día siguiente se hizo la preparación de DNA por el método de lisis alcalina (ver apéndice).

Mini-preparación de DNA por el método de lisis alcalina

La preparación de DNA por el método de lisis alcalina se hizo como se describe en el apéndice. Con el DNA que se obtuvo de cada colonia y con la ayuda de las enzimas de restricción, se determinó cuales fueron las colonias de bacterias que incorporaron al plásmido que tenía insertado el gene del canal.

Al final se obtuvieron 40 μl de DNA para cada colonia y se corrió 1 μl en un gel de agarosa. Por otra parte, se utilizó 1 μl de este DNA para hacer una digestión con las enzimas de restricción para ver que el DNA del canal GIRK5 se hubiera insertado en el vector pBB4.

La reacción fue la siguiente:

- 14 μl de agua BM
- 2 μl del buffer 10X del No. 1
- 1 μl de DNA de cada colonia
- 1 μl de la enzima Nhe I 10 U/ μl (GIBCO)
- 1 μl de la enzima Pst I 10 U/ μl (GIBCO)
- 1 μl de la enzima RNasa 10 mg/ml
- 20 μl volumen final de reacción

Se hizo una doble digestión con Sca I y Pst I para saber si el DNA del canal se encontraba insertado en el vector en sentido o en atisentido. Si el canal se encontraba en sentido deberíamos de esperar dos bandas una de 3862 pb y otra de 1738 pb. Si el canal se encontrara en antisentido deberíamos de esperar dos bandas una de 2938 pb y otra de 2662 pb.

La reacción que se hizo fue la siguiente:

- 14 μl de agua BM
- 2 μl del buffer 10X del No. 1
- 1 μl de DNA de cada colonia
- 1 μl de la enzima Sca I 10 U/ μl (GIBCO)

1 µl de la enzima Pst I 10 U/µl (GIBCO)

1 µl de la enzima RNasa 10 mg/ml

20 µl volumen final de reacción

Se incubó a 37 °C 1.5 hr

Se corrieron las digestiones en un gel de agarosa.

Maxipreparación de DNA con las columnas de Qiagen

Una vez que se encontró la colonia que contenía insertado el DNA del canal en el vector y en dirección en sentido, se escogió esta colonia para preparar una mayor cantidad de DNA.

Esta preparación se hizo con el kit Qiagen (Plasmid Maxi Kit 25).

Al final se obtuvieron 500 µl de DNA a una concentración de 2 µg/µl para dar un total de 1000 µg. Se hicieron las digestiones de este DNA con las enzimas de restricción Nhe I/ Pst I y Sca I/ Pst I para comprobar la orientación del DNA del canal.

Secuenciación

Se mando a secuenciar el DNA del canal con los iniciadores sentido y antisentido que se utilizaron para clonar al canal por el método automatizado (AB1 Prism 310, Perkin Elmer). Este DNA fue el que se utilizó para la producción del DNA recombinante del canal

c) Purificación del DNA recombinante en las células de insecto Sf21

Para mantener el cultivo de las células de insecto Sf21 estas se cultivaron en medio líquido a una densidad de 0.7×10^6 células por ml de medio Grace's (ver apéndice) y a una temperatura de 28 °C.

Para todos los experimentos descritos a continuación se utilizaron células Sf21 crecidas en medio Grace's completo y se mantuvieron a una temperatura de 28 °C, a menos que se especifique.

Todos los residuos de virus siempre se inactivaron en una solución desinfectante de cloro.

Cotransfección del DNA viral y del DNA del canal GIRK5

i) Formación de los liposomas

En un tubo Eppendorf se mezclaron 10 μ l de lipofectina (GIBCO BRL) con 5 μ l de agua estéril.

En un tubo Eppendorf se mezclaron 100 ng de DNA lineal del virus AcMNPV (Bac-N-Blue de Invitrogen) con 0.5 μ g de DNA del canal GIRK5. En otro tubo Eppendorf, se hizo lo mismo para 1 μ g de DNA del canal.

En un tubo Eppendorf se mezclaron 6 μ l de la mezcla de lipofectina con 6 μ l de la mezcla del DNA del virus y del canal.

Se incubaron a temperatura ambiente 15 min. (formación de liposomas).

ii) Cotransfección

Se sembraron 4 cajas de Petri de 35 mm con 1.5×10^6 células. Se esperaron 2 hr para que las células se adhirieran al plato.

Se lavaron las cajas dos veces con 2 ml de medio Grace's sin suero y sin suplementos.

Al final se agregó 1 ml de este medio en cada caja.

Se agregaron los liposomas virus/0.5 μ g de DNA de GIRK5 a una de estas cajas y virus/1 μ g de DNA de GIRK5 a otra caja. Las otras dos cajas se utilizaron como controles.

Se incubaron por 6 hr

Se agregó 1 ml de medio Grace's.

Se incubaron por 8 días.

Se recuperó el medio de cada caja; este contiene una mezcla de virus silvestre y recombinante. Se guardó a 4 °C protegido de la luz. El siguiente paso fue el de separar estos dos virus por ensayo de placa.

Para comprobar que la cotransfección funcionó bien, a la monocapa de células que se quedaron en el plato se les agregó 1 ml de medio Grace's y 20 μ l de X-gal

(2% en metil-formamida, guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Si la cotransfección funcionó bien los platos tienen que teñirse de azul.

Ensayo de placa

La cotransfección que se utilizó para este ensayo de placa fue la de virus/ 0.5 μg de DNA de GIRK5. Se hicieron diluciones en serie con 1ml de medio Grace's desde 10^{-1} hasta 10^{-6}

Se sembraron 7 cajas de 35 mm con 1.5×10^6 células. Se esperaron 2 hr para que las células se adhirieran al plato.

Se aspiró el medio de cultivo de cada caja.

Se agregaron 300 μl de cada dilución del virus a un plato de células.

Se incubaron por 1 hr con agitación manual cada 10 min.

Se aspiró el medio de cada caja con mucho cuidado.

Se agregaron a cada caja 2 ml de agarosa al 3 %/ medio Grace's (dilución 1:1) gota a gota alrededor de la caja. Se esperó hasta que la agarosa solidificara.

Se agregó 1 ml de medio Grace's a cada caja y se cubrieron estas alrededor con parafilm.

Se incubaron por 4 días.

Se agregaron a cada caja 20 μl de X-Gal y se volvieron a incubar por 3 días.

Se picaron 5 placas individuales azules con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril.

Cada placa se incubó en un pozo (caja multipozos de 12) con 0.5×10^6 células en 2 ml de medio Grace's.

Se incubaron por 6 días.

Se agregaron 20 μl de solución de X-gal a cada pozo que contenía a la placa. En 1 hr se desarrolló el color azul deseado en los pozos.

Se recuperó el sobrenadante de las 5 placas y se guardó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Amplificación del stock del virus

Se amplificaron los stocks de virus de la placa 1 y 2.

Se sembraron 2 cajas de Petri de 60 mm con 2×10^6 células.

Se tomaron 20 μ l del stock de virus de la placa 1 y 2 y se agregaron por separado a cada caja de células.

Se incubaron por 9 días.

Se colectó el sobrenadante de cada caja y se guardó a 4 °C protegido de la luz.

Con este stock de virus se hizo la titulación del virus.

Titulación del virus

Para la titulación del virus se utilizó el ensayo de placa descrito anteriormente.

Se utilizaron las diluciones de 10^{-4} a 10^{-9} del stock del virus de la placa 1.

Se incubaron las cajas por 6 días.

Se agregaron 20 μ l de X-gal a cada caja.

Dos días después se contaron el número de placas azules de cada caja. Con estos resultados se calculó la MOI (multiplicidad de infección) del virus para poder utilizarlo en la infección de las células Sf21 para los registros electrofisiológicos.

d) Comprobación por PCR de la producción del DNA recombinante del canal GIRK5

Se sembraron cajas de plástico de 100 mm con 8×10^6 células Sf21. Después de 2 hr se infectaron con el virus correspondiente:

2 cajas de células Sf21 se utilizaron como control sin infectar

2 cajas se infectaron con el virus recombinante del DNA del canal GIRK5

2 cajas se infectaron con el virus recombinante del DNA del receptor BK
(bradicinina)

Se incubaron por 72 hr a 28 °C.

Se preparó el RNA total de cada una de las condiciones por el método de trizol (ver apéndice).

Reacción de la RT

Se hizo la reacción de la transcriptasa reversa con este RNA para cada caso.

Se tomaron 5 µg de RNA total en 10 µl de volumen final en agua.

Se incubó a 65 °C por 10 min.

Se enfrió a 4 °C por 5 min.

Para la reacción de la RT a este RNA se le agregó lo siguiente:

4 µl de buffer 5X de RT

2 µl de dNTP's 10 mM (SIGMA)

2 µl de DTT 0.1M (GIBCO)

1 µl de hexámeros = 100 pmoles

1 µl de enzima RT GIBCO (200 U/ µl)

Se incubó a 37 °C por 1 hr y a 95 °C por 5 min.

Se agregaron 20 µl de agua BM para dar así un volumen final de reacción de 40 µl.

Se guardó esta reacción de RT a 4 °C y se utilizó durante una semana en las reacciones de PCR (reacción de la polimerasa en cadena).

Reacción de la PCR

Con los iniciadores sentido y antisentido con los que se clonó el gene del canal se hizo la PCR. Se hizo la reacción para cada una de las condiciones de infección y de las células control sin infectar. La reacción fue la siguiente:

34 µl de agua BM

5 µl de buffer 10X para la enzima Taq polimerasa

1.5 µl de cloruro de magnesio 50 mM

1 µl de dNTP's 10 mM

2 µl de primer up 10 µM

2 µl de primer low 10 µM

0.5 µl de taq polimerasa GIBCO (5U/ µl)

4 µl de cDNA de la reacción de RT

50 µl volumen final de la reacción de PCR

La reacción de PCR se hizo en un termociclador 2400 (Perkin Elmer). Se utilizó el programa siguiente:

1. 94 °C 5 min.
2. 94 °C 1 min.
3. 54 °C 1 min.
4. 72 °C 1 min. y 30 seg.
5. 72 °C 10 min.
6. 4 °C

del inciso 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos

Se utilizaron 10 µl de la reacción de PCR para identificar las bandas amplificadas en un gel de agarosa (ver apéndice).

e) Registros electrofisiológicos

Infección de las células Sf21 con el DNA recombinante del canal GIRK5

Para los registros de las corrientes del canal se sembraron cajas de Petri de 35 mm a una densidad de 0.7×10^6 células. Se infectaron con el virus a una MOI de 5. Se incubaron las células a 28 °C y la actividad del canal se registró 48 hr después de infectadas.

Condiciones de registro

La expresión del canal se determinó mediante el registro de las corrientes entrantes por la técnica de fijación de voltaje (patch clamp), (Hamill y col., 1981) en su modalidad de célula entera (whole cell). Los sellos de alta resistencia (1-3 GΩ) para estas células se alcanzaron por la aplicación de succión. Los electrodos tuvieron una resistencia entre 2.5 y 3 MΩ en la solución de registro. Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje de -160 a +30 mV en intervalos de 12 y un potencial de mantenimiento de -10 mV. Las corrientes fueron registradas con un amplificador para patch clamp Axopatch 200A, filtradas a 15 KHz y digitalizadas a

12.5 KHz. El registro de las corrientes se guardó directamente en el disco duro de la computadora a través de la interfase Digidata 1200 de Axon Instruments.

Soluciones de registro:

Todos los reactivos que se utilizaron para las soluciones de registro fueron de la marca SIGMA.

Solución de registro intracelular:

	[mM]
aspartato de potasio	145
cloruro de magnesio	2
EGTA (etilenglicol-bis (β -aminoetileter) N,N,N',N'-ácido tetraacético)	2
MES (2-[N-morfolino] ácido etanosulfónico)	10

Ajustado a un valor de pH de 6.2 y una osmolaridad de 350 mOsm (ajustado con manitol). En los ensayos donde se utilizó GTP γ S la concentración final fue de 100 μ M.

Solución de registro extracelular.

	[mM]
aspartato de potasio	145
cloruro de magnesio	2
cloruro de calcio	2
MES	10

Ajustado a un valor de pH de 6.2 y una osmolaridad de 350 mOsm.

Solución de registro extracelular de bajo potasio.

	[mM]
aspartato de potasio	50
cloruro de magnesio	2
cloruro de calcio	2
MES	10

Ajustado a un valor de pH de 6.2 y una osmolaridad de 350 mOsm.

VII. RESULTADOS

a) Clonación del gene del canal GIRK5

Purificación de la banda de DNAc del canal

Se hicieron los ensayos de RT-PCR (transcriptasa reversa-reacción de la polimerasa en cadena) utilizando diferentes condiciones experimentales. Se encontró la combinación adecuada de estas condiciones donde se obtuvo la banda deseada (ver materiales y métodos).

La banda que se encontró de 1200 pb (pares de bases) aproximadamente, por peso correspondía al canal GIRK5 que se trataba de clonar (figura 3A). Se purificó la banda a partir del gel de agarosa (figura 3B).

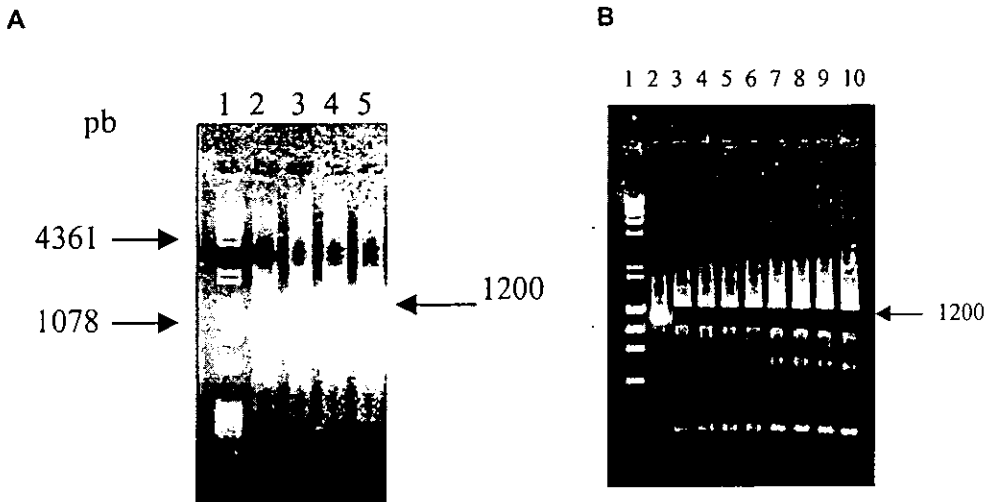


Figura 3. Purificación de la banda de DNAc del canal GIRK5. Gel de agarosa para DNA. **3A.** Carril 1) Marcador λ / Hind III y ϕ X174 RF DNA/ Hae III; 2 a 5) 10 μ l de la reacción de PCR/ carril. **3B** 1) Marcador λ / Hind III y ϕ X174 RF DNA/ Hae III; 2 a 10) 10 μ l de la reacción de PCR/ carril (espacio donde se cortó la banda de 1200 pb).

El DNA del vector pBF y la banda de DNA del canal que se obtuvo por PCR se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes y se ligaron y transformaron en las células competentes (ver Material y Métodos). El peso del vector y del canal fueron de 3000 y de 1200 respectivamente (figura 4).

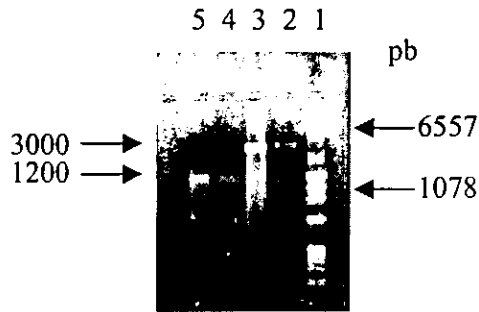


Figura 4. Fragmentos de DNA del vector pBF y del canal GIRK5 para la ligación. Gel de agarosa. Carril 1) Marcador λ / Hind III y ϕ X174 RF DNA/ Hae III; 2 y 3) 5 y 10 μ l respectivamente de la purificación del vector; 4 y 5) 5 y 10 μ l respectivamente de la purificación del canal GIRK5.

En la reacción de ligación y transformación del DNA del vector y del canal se obtuvieron las colonias bacterianas. De éstas bacterias transformadas se hizo una mini-preparación de DNA. Mediante ensayos con diferentes enzimas de restricción se verificó que el DNA del canal se encontraba insertado en el vector y en dirección correcta (ver Material y Métodos).

Se seleccionó una de estas colonias bacterianas y se hizo la purificación de DNA con un mayor grado de pureza (columnas Qiagen). Al final se obtuvieron 500 μ l de DNA a una concentración de 0.6 μ g/ μ l es decir 400 μ g totales.

Una muestra de este DNA se secuenció manualmente con el kit de la termosecuencia de Amersham. También se secuenció por el método automatizado (AB1 Prism 310, Perkin Elmer).

Secuenciación

Con la secuencia de bases se hizo el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del canal que se clonó (ver alineamiento en la página siguiente). Se comparó esta secuencia con la previamente reportada (Hedin y col., 1996). Se encontró que el DNA del canal GIRK5 que se clonó de los ovocitos de la rana de *Xenopus laevis*, corresponde a una versión truncada del gene correspondiente. Por consiguiente nuestro clon en realidad corresponde a un canal GIRK5 Δ 25.

Los resultados obtenidos muestran la clonación del DNA del canal con 25 aminoácidos más corto hacia la región amino terminal.

El gene de este canal presenta tres sitios probables de iniciación pero no se sabe si el ovocito expresa las tres isoformas y si son funcionales como homo o heteromultímeros.

Las otras dos isoformas tienen 20 y 25 aminoácidos más respectivamente, hacia la región amino terminal.

Se encontraron 4 diferencias en la secuencia de aminoácidos entre el GIRK5 clonado en 1996 (Hedin y col.) y el GIRK5 Δ 25. En el asa entre la región de M1 y H5 en la posición 156 la asparagina (N) cambio por una isoleucina (I). En la región M2 en la posición 187 la isoleucina (I) cambio por una treonina (T). En la región intracelular en el carboxilo terminal la leucina (L) 417 cambió por una arginina (R) y no se encontró en este canal la glicina (G) 418.

Para comprobar que estas diferencias no se debieran a errores técnicos se hicieron experimentos control. Se preparó independientemente el RNA total de 3 ranas diferentes.

Se compararon las secuencias de aminoácidos de estas ranas con el canal GIRK5 Δ 25 y resultaron exactamente iguales. Estos resultados sugieren que el gene del canal GIRK5 presenta polimorfismo.

	1		60
GIRK5Δ25	M-----	ARDLRVSMNQDLKVDITPKKLPKQAREDPKRSID	
GIRK5		MIPEMAPSPQWKRLYESPQLIQTIMARDLRVSMNQDLKVDITPKKLPKQAREDPKRSID	
	61		120
GIRK5Δ25		RTHLLFEHKKPRQRYMEKDGKCNVHHGNVKETYRYFSDLFTTLVDLKWHFSLFIFTLVYT	
GIRK5		RTHLLFEHKKPRQRYMEKDGKCNVHHGNVKETYRYFSDLFTTLVDLKWHFSL <u>FIFTLVYT</u>	
	121		180
GIRK5Δ25		VTWLFGLIWLIAYIRGDLHLGDKNWPCVENLIGFVSAFLFSIETETTIGYGYRVIT	
GIRK5		<u>VTWLFGLIWLIAYIRGDLHLGDKNWPCVENLNGFVSAFLFSIETETTIGYGYRVIT</u>	
	181	M1	H5 240
GIRK5Δ25		EKCPEGTVLLLVQAILGSI ¹⁸⁷ VNALMVGCMFVKISQPKKRAETLMFSNNAVISLRDGKLCCLM	
GIRK5		EKCPEGIVLLLVQAILGSI ¹⁸⁷ VNALMVGCMFVKISQPKKRAETLMFSNNAVISLRDGKLCCLM	
	241	M2	300
GIRK5Δ25		FRVGDRLRSSHIVEASIRAKLIKSKQTKEGEFIPLNQTDINVGFDTGDDRLFLVSPLIISH	
GIRK5		FRVGDRLRSSHIVEASIRAKLIKSKQTKEGEFIPLNQTDINVGFDTGDDRLFLVSPLIISH	
	301		360
GIRK5Δ25		EINEKSPFWEMSRTQLEIEE ³⁰⁷ FEIVVILEGMVEATGMTQCARSSYVDSEVLWGH ³¹⁷ RFPVLT	
GIRK5		EINEKSPFWEMSRTQLEIEE ³⁰⁷ FEIVVILEGMVEATGMTQCARSSYVDSEVLWGH ³¹⁷ RFPVLT	
	361		420
GIRK5Δ25		LEKGFYEVDY ³⁶⁷ TFH ³⁷⁷ DN ³⁸⁷ YETPTPSCSAKELKEIQHGEQVLHHTYTQQRKNSAQNGAPR SE	
GIRK5		LEKGFYEVDY ³⁶⁷ TFH ³⁷⁷ DN ³⁸⁷ YETPTPSCSAKELKEIQHGEQVLHHTYTQQRKNSAQNGAPL ³⁹⁷ GS	
	421	429	
GIRK5Δ25		DLNRR ⁴²⁷ TQPD	
GIRK5		DLNRR ⁴²⁷ TQPD	

Comparación entre la secuencia de aminoácidos del canal GIRK5 previamente reportado (Hedín y col.,1996) y el canal GIRK5Δ25 clonado. En negritas se muestran las 4 diferencias entre ambas secuencias. En el asa entre la región de M1 y H5 en la posición 156 la asparagina (N) cambio por una isoleucina (I). En la región M2 en la posición 187 la isoleucina (I) cambio por una treonina (T). En el carboxilo terminal la leucina (L) 417 cambio por una arginina (R) y no se encontró en este canal la glicina (G) 418.

b) Subclonación del DNA del canal GIRK5 Δ 25 en el vector de expresión para las células de insecto

Lo primero que se hizo fue liberar el DNA del canal GIRK5 Δ 25 del vector pBF con las enzimas de restricción. El DNA del vector pBB4 y la banda de DNA del canal se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes y se ligaron y transformaron en las células competentes (ver Material y Métodos). El peso del DNA del vector y del canal fueron 4800 y de 1200 respectivamente (figura 5).

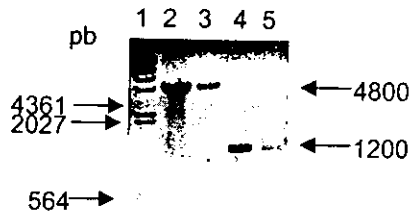


Figura 5. Fragmentos para la ligación del DNA del canal y del vector. Gel de agarosa. Carriles 1) Marcador λ / Hind III; 2 y 3 vector pBB4 5 μ l de la 1^a y 2^a purificación; 4 y 5 canal GIRK5 5 μ l de la 1^a y 2^a purificación.

En la reacción de ligación y transformación del DNA del vector y del canal se obtuvieron las colonias bacterianas. De éstas bacterias transformadas se hizo una mini-preparación de DNA. Mediante ensayos con diferentes enzimas de restricción se verificó que el DNA del canal se encontraba insertado en el vector y en dirección correcta (ver materiales y métodos).

Se seleccionó una de estas colonias bacterianas y se hizo la purificación de DNA con un mayor grado de pureza (columnas Qiagen).

Una muestra de este DNA se mando a secuenciar por el método automatizado (AB1 Prism 310, Perkin Elmer).

La secuencia del DNA del canal GIRK5 Δ 25 subclonado en el vector pBB4 de células de insecto corresponde al canal original. No se observó ningún cambio

en la secuencia de bases. Por consiguiente, no hubo cambio en la secuencia de aminoácidos al subclonarlo en otro vector.

c) Purificación del DNA recombinante

En la cotransfección del DNA del canal y del virus la concentración más adecuada del canal fue 500 ng.

Se utilizó el sobrenadante de esta cotransfección para el ensayo de placa. Se hicieron diferentes diluciones de este sobrenadante y se contaron el número de placas que se formaron en cada caso (ver Materiales y Métodos).

Del virus amplificado de una placa viral se hizo la titulación, con la ayuda del ensayo de placa.

Se utilizó la dilución 10^{-6} y se calculó la MOI (multiplicidad de infección) del virus recombinante. Se calcularon los ml de inóculo del virus necesarios para infectar las células de insecto Sf21.

En la figura 6A se muestra en resumen toda la metodología que se utilizó para producir el DNA recombinante del canal GIRK5 en las células de insecto Sf21.

d) Comprobación por PCR de la producción del DNA recombinante del canal GIRK5

Para la comprobación de que el virus recombinante contenía el mensaje para la producción del gene del canal GIRK5 se hicieron los ensayos de RT-PCR, se utilizaron los iniciadores 5' y 3' específicos para amplificar el DNA del canal GIRK5.

Se utilizó el RNA total de células de insecto Sf21 sin infectar e infectadas con el DNA del virus recombinante del canal. Como control de infección se utilizó el DNA del virus recombinante del receptor a bradiginina.

Como se puede ver en la figura 6B, se observa la banda de 1200 pb que corresponde al DNA del canal GIRK5 en las células Sf21 infectadas con el virus recombinante. Se observa una banda similar al control positivo de PCR que es el

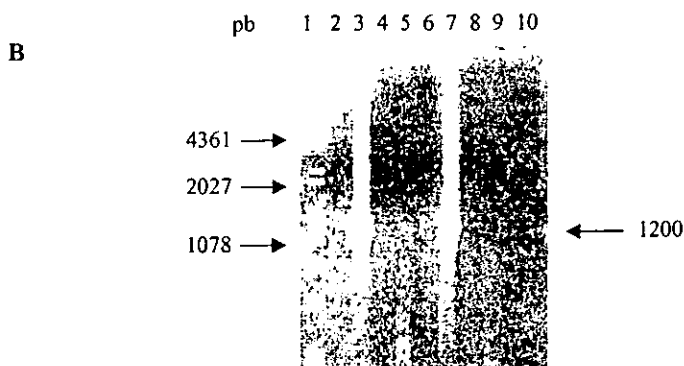
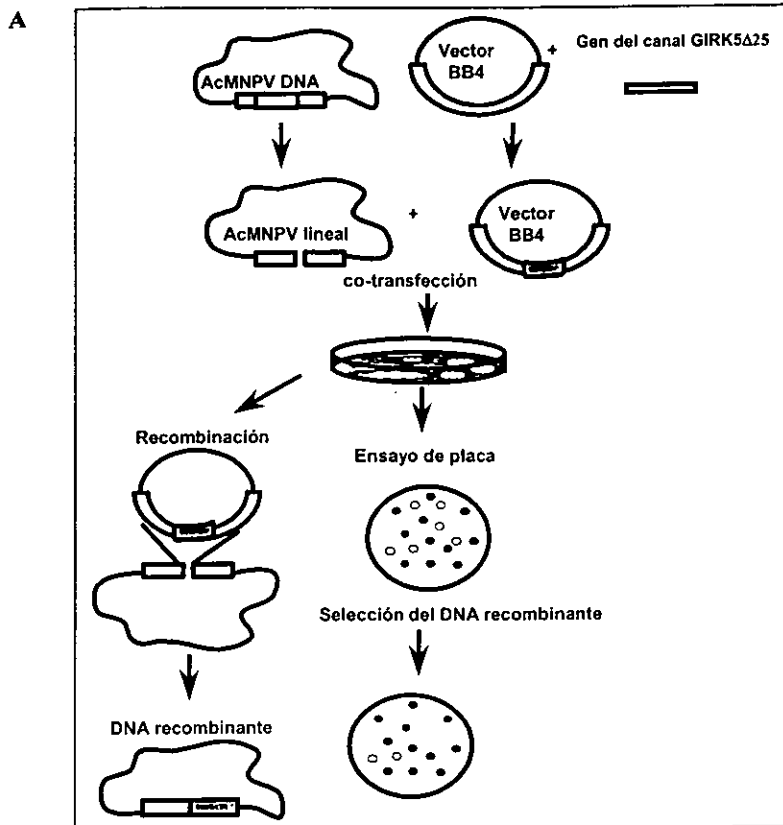


Figura 6. Producción del DNA recombinante (A). Subclonación del DNA del canal GIRK5Δ25 en el vector pBB4, cotransfección, amplificación y purificación del DNA recombinante. Comprobación por PCR (**B**). Carril 1) Marcador λ / Hind III y ϕ X174 RF DNA/ Hae III; 3) control de amplificación vector pBF/GIRK5; 5) células de insecto Sf21 sin infectar; 7) células de insecto infectadas con el DNA recombinante de GIRK5Δ25; 9) células de insecto infectadas con el DNA recombinante del receptor a bradicinina; 10) control negativo de amplificación. Gel de agarosa para DNA.

DNA del canal ligado al vector de expresión para ovocitos. Lo anterior muestra que el virus recombinante infecta a las células de insecto, de tal forma que se pueden utilizar estas células para los registros electrofisiológicos.

En los controles negativos: células Sf21 sin infectar; células Sf21 infectadas con el virus recombinante para el receptor de bradicinina y el control negativo de la PCR no se observa ninguna banda.

e) Registros electrofisiológicos

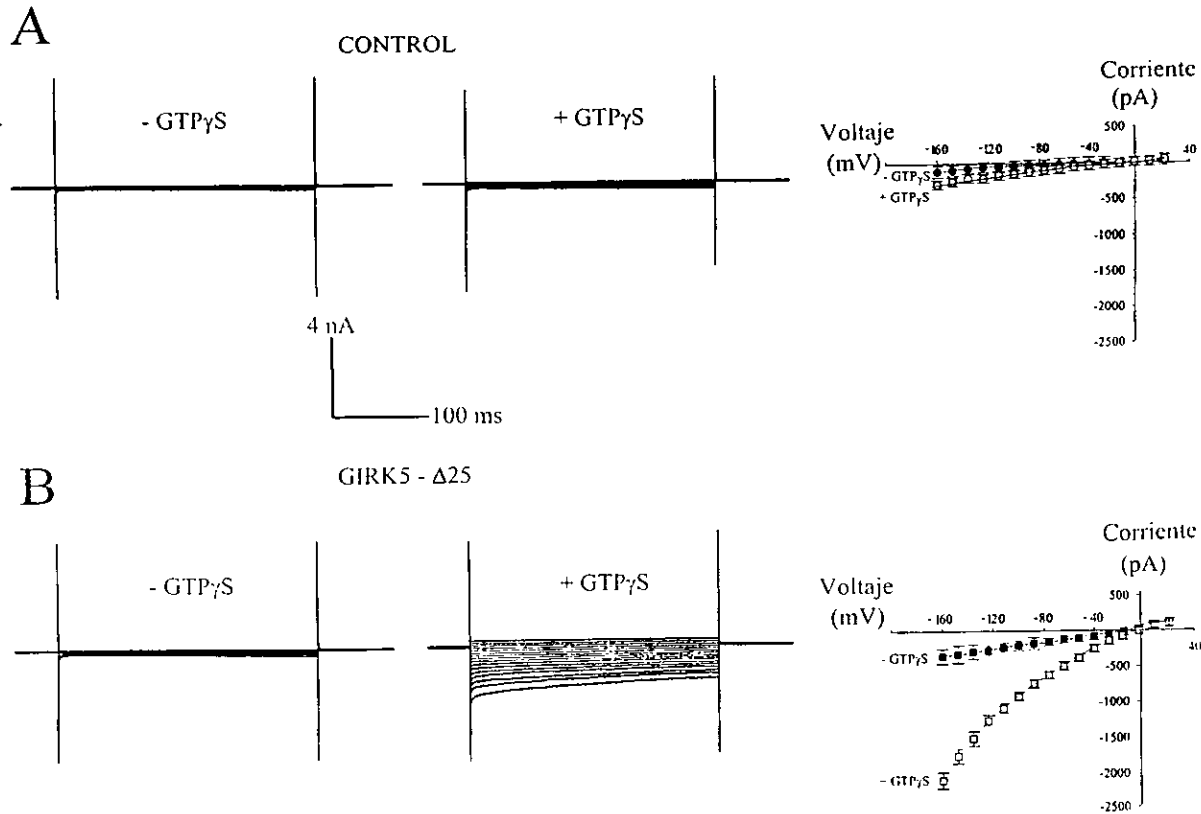
La actividad del gene del canal se determinó por las corrientes entrantes medidas con la técnica de fijación de voltaje (patch clamp), en su modalidad de célula entera (whole cell).

En la figura 7A podemos observar el tipo de corrientes que se presentan en las células de insecto Sf21 sin infectar (control). En los registros sin GTP γ S (-) se obtuvieron 150 ± 75 pA y con GTP γ S (+) 200 ± 50 pA a -160 mV, $n= 6$, no se observan corrientes entrantes ni salientes significativas. Se realizó un protocolo de pulsos de -160 a $+30$ con intervalos de 12 mV para determinar la relación de corriente en función del voltaje (I-V). Por lo anterior, el sistema de expresión del baculovirus en las células de insecto es un buen sistema para poder medir las corrientes entrantes de potasio del canal GIRK5 Δ 25.

En la figura 7B, se observa que en las células de insecto SF21 infectadas con el DNA recombinante del canal GIRK5 sin GTP γ S (-), se observa corriente entrante de 180 ± 45 pA que es indistinguible de las células control sin infectar. En el caso de estas mismas células, pero registradas con GTP γ S (+) se observa un nivel de corriente entrante mayor 1600 ± 280 pA a -160 mV, $n= 7$. En presencia de GTP γ S se observa un aumento aproximado de 8 veces en el nivel de corriente entrante.

Lo anterior sugiere que la actividad de este canal es dependiente de la disociación de las proteínas G endógenas de las células de insecto.

Se hizo el ensayo de la actividad del canal dependiente de GTP γ S en el tiempo (curso temporal de un experimento representativo, figura 8).



45 **Figura 7. Registro de las corrientes entrantes en células de insecto Sf21. Células control sin infectar (A). Células infectadas con el virus recombinante del canal GIRK5 Δ 25 (B). Registro de las corrientes por la técnica de fijación de voltaje en su modalidad de célula entera. La solución de registro fue simétrica de K⁺ 145 mM. Se agregó 100 μ M de GTP γ S en la solución interna (+GTP γ S) y sin GTP γ S (-GTP γ S). Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje entre -160 y +30 mV en intervalos de 12 mV. El potencial de mantenimiento de -10 mV y con una duración de 300 mseg. Curva I-V de las corrientes los símbolos llenos son sin GTP γ S y los vacíos con GTP γ S.**

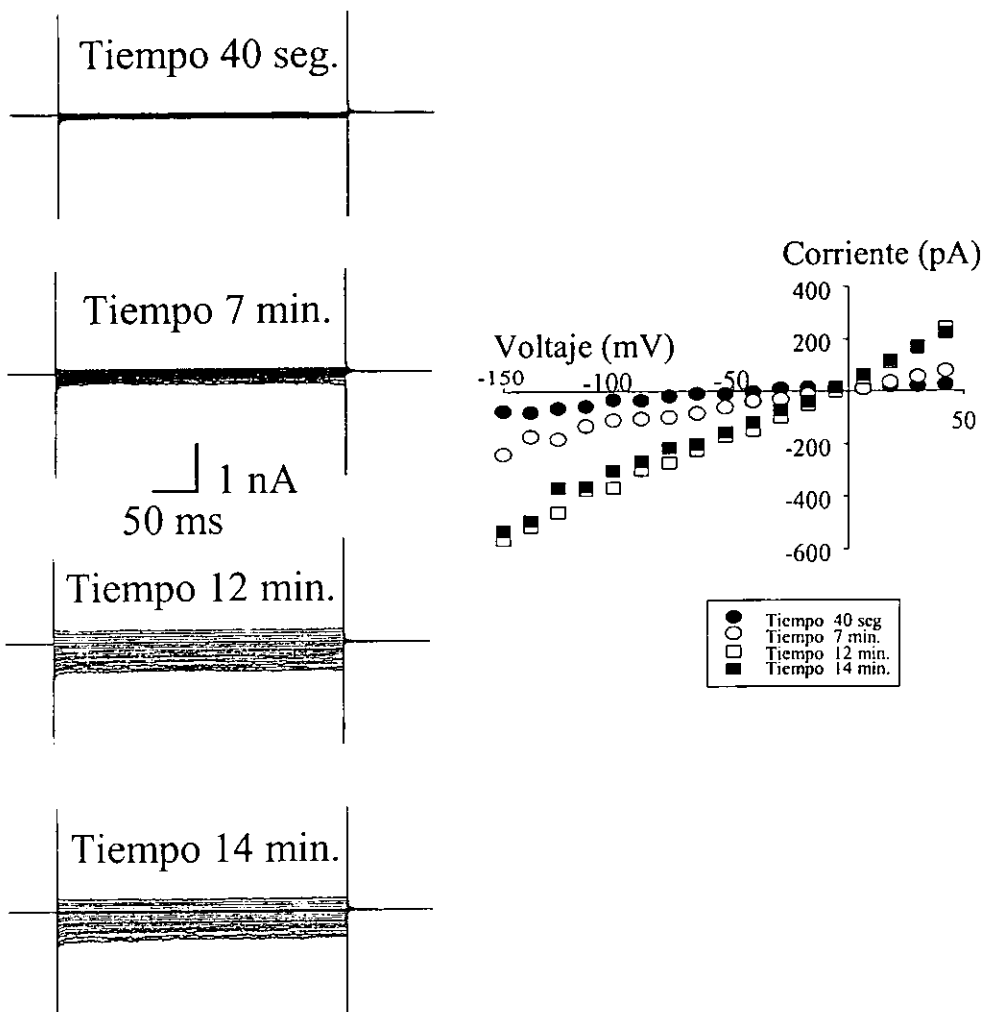


Figura 8. Curso temporal de la actividad del canal GIRK5 Δ 25 dependiente de proteínas G. El registro de las corrientes por la técnica de fijación de voltaje en su modalidad de célula entera. Registros en solución simétrica de K⁺ 145 mM. Se agregó 100 μ M de GTP γ S en la solución interna. Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje entre -160 y +30 mV en intervalos de 12 mV. El potencial de mantenimiento de -10 mV y con una duración de 300 msec.

Curva I-V de las corrientes a diferentes tiempos de aplicación del GTP γ S.

En la figura 8 a los 40 seg. de incubación con el GTP γ S no se observa corriente entrante en la actividad del canal (70 pA). A los 7 min ya se observa la corriente entrante (211.6 pA) que alcanza su máximo a los 12 min (606.5 pA). Estos resultados muestran la activación del canal dependiente del tiempo, para que el GTP γ S difunda en la célula y active a las proteínas G y así alcanzar la actividad máxima del canal.

En el experimento con concentraciones de K $^{+}$ simétrico (145 mM) el potencial de inversión calculado es de cero y el observado fue muy cercano a cero mV. Para determinar la participación del K $^{+}$ en esta corriente entrante se cambió la concentración de K $^{+}$ externa de 145 a 50 mM. Después de hacer este cambio se observó un corrimiento en el potencial de inversión hacia valores más negativos. Bajo la condición de K $^{+}$ (50 mM) el potencial de reversión observado fue de 25 ± 3 mV, $n=7$. Este valor es muy cercano al potencial de equilibrio calculado con la ecuación de Nerst, para un electrodo selectivo a potasio en estas condiciones (27 mV). Los resultados de un experimento representativo se muestran en la figura 9. En este ensayo se utilizó 145 y 50 mM de K $^{+}$ externo. Se graficaron los datos obtenidos en la curva de corriente contra voltaje. En la figura 9 (recuadro) se observa mejor el corrimiento hacia la izquierda en el potencial de inversión de la corriente. Lo anterior demuestra que el canal GIRK5 Δ 25 expresado en las células de insecto es selectivo para K $^{+}$.

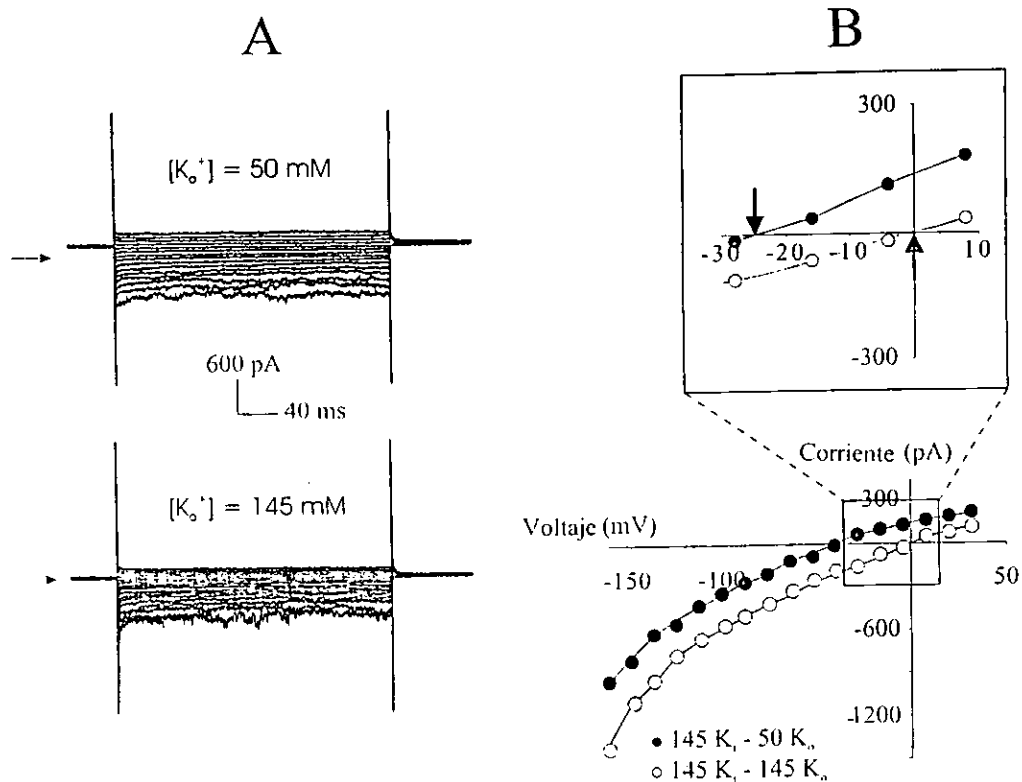


Figura 9. Registros de las corrientes entrantes en células de insecto Sf21. Células infectadas con el virus recombinante del canal GIRK5 Δ 25. Registro de las corrientes por la técnica de fijación de voltaje en su modalidad de célula entera. La solución de registro intracelular fue 145 mM de K^+ y la extracelular 50 y 145 mM para cada caso. En la solución intracelular se agregó 100 μM de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ concentración final. Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje de -160 a $+30$ mV en intervalos de 12 mV. El potencial de mantenimiento fue de -10 mV y con una duración de 300 msec. Curva I-V de estas corrientes, círculos vacíos 145 mM de K^+ y círculos llenos 50 mM de K^+ externo.

VIII. DISCUSION

Actividad del gene del canal GIRK5Δ25 en los ovocitos

La actividad basal de los canales GIRK

La actividad basal que se registra al expresar los canales GIRK en un sistema de expresión heterólogo se define como aquella corriente que se registra sin la necesidad de activar los receptores acoplados a estos canales. En este caso, la actividad basal es la corriente que se registra al inyectar el ovocito con el cRNA del canal. Esta corriente se debe a la activación de los canales GIRK por sustratos endógenas del propio ovocito. Dentro de los principales reguladores de la actividad basal de estos canales se encuentran el dímero Gβγ, el ATP-Mg²⁺, el Na⁺ y el PIP₂ (Dascal, 1997).

La expresión heteróloga del GIRK1 con el GIRK4 (GIRK1/GIRK4/ heteromultímeros) en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* produce corrientes basales que son indistinguibles de la corriente K_{ACh} nativa. Este heteromultímero produce corriente del orden de 4 μA (Chan y col., 1996b).

En contraste con el canal GIRK1/GIRK4, los canales del GIRK1 y del GIRK4 producen corrientes basales de muy baja actividad, por debajo de 0.5 μA (Chan y col., 1996b). Estas corrientes se encuentran muy cercanas a la corriente endógena del ovocito 0.4 μA (Salvador y col., 2001).

La característica más importante del canal GIRK5Δ25 que se clonó en este trabajo, es el nivel de actividad basal que se obtiene al expresarlo en los ovocitos que es del orden de 5-10 μA. Valores de corriente semejantes se reportan en la isoforma del canal GIRK2δ que también forma homomultímeros pero en este caso no es la actividad basal del canal sino a través de la activación por el receptor muscarínico m₂ (m₂); (Inanobe y col., 1999). El valor de la actividad basal del canal GIRK5Δ25 (5-10 μA) es un orden de magnitud mayor al obtenido con el canal endógeno del ovocito, el GIRK1 y el GIRK4 (menor a 0.5 μA); ver tabla1.

Se ha encontrado una solución para la expresión de homomultímeros funcionales del canal GIRK1 y el GIRK4. Al hacer las mutaciones puntuales en el GIRK1, la fenilalanina se cambió por la serina (F137S) y en el GIRK4 la serina 143 se cambio por la treonina (S143T), en ambos casos estas mutaciones se encuentran en la región del poro del canal (Chan y col., 1996b). Con estas mutaciones se logró obtener el nivel de la corriente basal del orden del canal GIRK1/GIRK4 heteromultímero y de nuestro canal GIRK5Δ25 homomultímero (tabla 1). Cabe mencionar que en nuestro caso no hubo la necesidad de hacer ninguna mutación en el canal clonado para poder obtener niveles de corriente basales de 5-10 μ A.

Para comprobar que el canal GIRK5Δ25 forma homomultímeros funcionales se inyectaron cantidades crecientes de cRNA del canal en los ovocitos. Si el GIRK5Δ25 formara heteromultímeros con alguna subunidad endógena, al incrementar las cantidades de cRNA se tendría que esperar un nivel de corriente saturable ya que los GIRK endógenos serían el factor limitante para poder formar heteromultímeros con el canal clonado. Contrario a esto se observó un incremento en el nivel de corriente al aumentar a la cantidad de cRNA inyectado (datos no mostrados), lo cual sugeriría que el canal GIRK5Δ25 forma homomultímeros.

Se ha reportado en la literatura ésta forma de determinar la formación de homomultímeros en el canal GIRK1 y en el GIRK1(F137S); (Vivaudou y col., 1997). Se observa mejor en el canal GIRK1 mutado ya que se muestra claramente un aumento proporcional en el nivel de corriente basal con respecto a la cantidad de cRNA inyectado en el ovocito (de 0.005 a 5 ng).

Corriente basal

cRNA (ng)	Corriente (μ A)
0.005	< 1
0.5	< 1
5	1

Esto demuestra que el canal GIRK1 al ser inyectado en los ovocitos forma homomultímeros funcionales (Vivaudou y col., 1997). El mismo efecto se presenta en la corriente de este canal inducida a través del receptor m_2 .

Corriente inducida a través de m_2

cRNA (ng)	Corriente (μ A)
0.005	< 1
0.5	3-4
5	12-13

En la tabla 1 se muestra la comparación en el nivel de corriente basal del canal clonado GIRK5 Δ 25 con los demás canales GIRK (se trato de igualar las condiciones de registro para poder hacer esta comparación).

En esta tabla se ve que para alcanzar un nivel de corriente basal del orden de 4 μ A se tienen que expresar canales heteromultímeros u homomultímeros, pero mutados. Lo anterior contrasta con el canal GIRK5 Δ 25 que alcanza este nivel de corriente en forma de homomultímero y sin hacer ninguna mutación.

TABLA 1

Canal	Endógena	GIRK1/GIRK4	GIRK1	GIRK4	GIRK5 Δ 25	GIRK3.2d + m_2 R	GIRK1 F137S	GIRK1 F137S /GIRK4
K ⁺ ext (mM)	91	91	91	91	118	90	91	91
V (mV)	-80	-80	-80	-80	-85	-60	-80	-80
I (μ A)	< 0.5	4	< 0.5	< 0.5	5	1.2	1	4
cRNA(ng)	0	2	2	2	10	2	2	2
Referencias	3	1	1	1	3	2	1	1

- 1.- Chan y col., 1996b.
- 2.- Inanobe y col., 1999.
- 3.- Salvador y col., 2001.

NOTA: En esta tabla se muestran los valores promedio de las corrientes. Los investigadores registraron la actividad de los canales en los ovocitos a diferentes tiempos después de ser inyectados con el cRNA (24-72 hr.).

Tratando de explicar la formación de homomultímeros funcionales del canal GIRK5 Δ 25 con lo reportado en la literatura se tiene lo siguiente:

El canal GIRK2 presenta 4 isoformas formadas por el empalme alternativo (Inanobe y col., 1999). Estas isoformas difieren entre ellas en la longitud del dominio amino o carboxilo terminal. La isoforma GIRK2a es 11 aminoácidos más corta hacia la región carboxilo terminal con respecto a GIRK2c y GIRK2d. Las isoformas GIRK2a, GIRK2b y GIRK2c presentan un dominio amino terminal más largo. La isoforma GIRK2d es 18 aminoácidos más corta en la región del amino terminal respecto al gene completo como se muestra en el alineamiento de aminoácidos siguiente:

GIRK2d	1MD	QDVES	25
GIRK2c	1	MTMAKLTESM TNVLEGDSMD	QDVES	25
GIRK2b	1	MTMAKLTESM TNVLEGDSMD	QDVES	25
GIRK2a	1	MTMAKLTESM TNVLEGDSMD	QDVES	25
GIRK5	1	MI PERMAPSP QWKRLYESPQ LIQT I		25
GIRK5 Δ 25	1MARDL	RVSMN	35

Una característica común entre la isoforma GIRK2d y el canal GIRK5 Δ 25 es que ambos presentan la región amino terminal más corta. Al comparar el

alineamiento de aminoácidos entre estos dos canales no se observa ninguna homología aparente. A nivel estructural tal vez la falta de estos aminoácidos hacia la región amino terminal juegue un papel muy importante en la regulación, la expresión o el ensamblaje de homomultímeros funcionales.

El canal GIRK5 Δ 25 del ovocito presenta la mayor homología con el canal GIRK4 de mamífero. Por lo tanto, el canal GIRK5 Δ 25 podría ser un buen modelo para el estudio de la contribución de la subunidad GIRK4 en la funcionalidad del canal heteromultímero GIRK1/GIRK4.

Por otro lado, ¿cómo explicar la actividad basal del canal GIRK5 Δ 25 en el ovocito? En los experimentos no se agregó el agonista del receptor para activar a las proteínas G endógenas y tampoco se coinyectaron los cRNAs de las subunidades G $\beta\gamma$; sin embargo, observamos la corriente de potasio rectificadora entrante.

La corriente endógena en algunos ovocitos de la rana *Xenopus laevis* es grande (0.5- 2 μ A), la cual se ha explicado por la activación de las subunidades G $\beta\gamma$ del ovocito. Esta corriente se presenta aún en ausencia de agonista unido a su receptor, como lo han demostrado estudios previos (Lesage y col., 1994; Hedin y col., 1996, Kofuji y col., 1996 y Tucker y col., 1996).

La corriente basal de potasio rectificadora entrante que observamos con el canal GIRK5 Δ 25 se puede explicar por la activación por las proteínas G $\beta\gamma$ endógenas del ovocito.

Otros reguladores de la actividad basal del canal GIRK5 Δ 25 son el Na⁺ y el PIP₂. El grupo de Sui y col., 1998 en experimentos en parches de membrana en la configuración de "inside-out" en las células de aurícula y en los ovocitos de la rana *Xenopus* expresaron los canales de GIRK1/GIRK4. Se observó que el PIP₂ incrementa el tiempo de apertura de los canales GIRK activados por el G $\beta\gamma$. Estos canales también se vuelven más sensibles a la activación por el ión Na⁺.

En la secuencia de aminoácidos siguiente se muestra parte de la secuencia del canal GIRK5 Δ 25 en la región del carboxilo. Se observan en negritas las dos argininas importantes para la interacción del canal con el PIP₂ y la isoleucina 229 que regula la actividad del canal GIRK4 por el PIP₂. Tomando en cuenta estos

resultados se puede sugerir que la actividad del canal GIRK5 Δ 25 expresado en los ovocitos se regula también por el PIP₂.

GIRK5 Δ 25 KKRAETLMFSNNAV I SLRDGK.....
(229)

Actividad del gene del canal GIRK5 Δ 25 en las células de insecto

Fue importante expresar el canal GIRK5 Δ 25 en un sistema de expresión diferente al del ovocito para corroborar los resultados obtenidos previamente.

La expresión del canal en las células de insecto demuestra que se forman homomultímeros estables ya que estas células no tienen canales de potasio rectificadores entrantes endógenos. Esto se comprobó en los registros donde no se observaron corrientes entrantes significativas de potasio y mediante los experimentos de PCR en los que se concluye que no se expresan canales GIRK endógenos.

En los experimentos de patch clamp, en su modalidad de célula entera, se da el cambio de sustancias entre la pipeta de patch y los componentes citoplásmicos, como consecuencia, estos últimos se lavan.

En las células de insecto resultó evidente que el canal GIRK5 Δ 25 necesita ser activado por las proteínas G ya que si no se adiciona el GTP γ S en la solución de registro interno no se observa la corriente entrante de potasio. El GTP γ S es el análogo no hidrolizable del GTP y activa al canal en ausencia del agonista. De tal modo que se secuestran las G α por el GTP γ S y quedan libres la G $\beta\gamma$ endógenas para activar al canal.

Con estos resultados se confirman los resultados obtenidos de la actividad del canal GIRK5 Δ 25 en el sistema de expresión de los ovocitos.

Otro de los activadores de la actividad basal del canal GIRK5 Δ 25 es el ATP-Mg. En las células de insecto se trató de estudiar el efecto que tenía este activador en las corrientes de potasio del canal GIRK5 Δ 25. El ATP-Mg en las células de insecto Sf21 control (sin infectar) induce la activación de corrientes entrantes no selectivas bajo las condiciones de registro para el canal clonado. Por esta razón no fue posible continuar con estos experimentos ya que este sistema de expresión no es el adecuado para estudiar el efecto del ATP-Mg en la actividad del canal GIRK5 Δ 25.

IX. CONCLUSIONES

1.- El gene del canal GIRK5 Δ 25 puede funcionar como un homomultímero activado por proteínas G endógenas que producen un nivel basal de corriente alto, no comparable con ningún canal de esta subfamilia.

2.- El sistema de expresión del baculovirus en las células de insecto Sf21, fue un buen modelo para expresar canales GIRK pero no para estudiar su activación por los activadores Mg-ATP-Na⁺.

X. BIBLOGRAFIA

- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV, Boyd AE III. 1995. Cloning of the β cell high affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. **268**: 423-426.
- Ammala C, Moorehouse A, Glibe F, Ashfield R, Proks P. 1996. Promiscuous coupling between the sulfonylurea receptor and the inward rectifier potassium channels. *Nature*. **379**: 545-548.
- Bauer CK, Falk T, Schwarz JR. 1996. An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch*. **432**: 812-820.
- Birnbaumer L y Birnbaumer M. 1995. Signal transduction by G protein: 1994 edition. *J. Rec. Signal Transduct. Res*. **15**: 213-252.
- Birnbaumer L. 1992. Receptor to effector signaling through G proteins: roles of beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell*. **71**:1069-72.
- Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH. 1995. ROMK inwardly rectifying ATP sensitive K channel II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am. J. Physiol*. **268**: F1132-F1140.
- Bond CT, Pessia M, Xia XM, Lagrutta A, Kavanaugh NP, Adelman JP. 1994. Cloning and expression of a family of inward rectifying potassium channels. *Receptors and Channels*. **2**: 183-191.
- Breitwieser GE, Szabol G. 1988. Mechanism of muscarinic receptor induced K^+ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J. Gen. Physiol*. **91**: 469-493.
- Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Lyengar R. 1990 Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G_i proteins. *J. Biol. Chem*. **265**: 6268-6273.
- Chan KW, Langan MN, Sui JL, Kozack JA, Pabon A, Ladias JAA, Logothetis DE. 1996a. A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J Gen Physiol*. **107**: 381- 397.
- Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE. 1996b. Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K^+ channel subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 14193- 14198.
- Chang H, Jan YN, Jan LY. 1996. A strongly inwardly rectifying K^+ channels modulated by M1 acetylcholine receptor. *Biophys. J*. **70**: A73.
- Chen J, De Vivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH, Inglese J, Lefkowitz RJ, Logothetis DE, Hildebrandt JD, Lyengar R. 1995. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science*. **268**: 1166-1169.
- Clapham DE, Neer EJ. 1993. New roles of G protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. **365**: 403-406.
- Cohen GB, Ren R, Baltimore D. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*. **80**: 237-248.
- Dascal N, Ifune C, Hopkins R, Snutch TP, Lubbert H, Davidson N, Simon MI, Lester HA. 1986. Involvement of a GTP-binding protein in mediation of serotonin and acetylcholine responses in *Xenopus* oocytes injected with rat brain messenger RNA. *Brain Res*. **387**:201-209.
- Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. 1993. Atrial G protein-activated K^+ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 10235-10239.
- Dascal N. 1997. Signalling via the G protein-activated K^+ channels. *Cell Signal*. **9**: 551-573.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. 1995. The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol*. **5**: 268 277.

- Fakler B, Brandle U, Glowatski E, Zenner HP, Ruppersberg JP. 1994. Kir 2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinase and ATP hydrolysis. *Neuron*. 13: 1413-1420.
- Ferrer J, Nichols CG, Makhina EN, Salkoff L, Bernstein J, Gerhard D, Wasson J, Ramanadham S, Permutt A. 1995. Pancreatic islet cells express a family of inwardly rectifying K⁺ channel subunits which interact to form G-protein-activated channels. *J. Biol. Chem.* 270: 26086-26091.
- Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP. 1976. Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 67: 621-638.
- Hagiwara S, Takahashi K. 1974. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of starfish egg cell. *J. Memb. Biol.* 18: 61-80.
- Hamm HE, Deretic D, Arendt A, Hargrave PA, Koenig B, Hofmann KP. 1988. Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science*. 241: 832-835.
- Hamm HE, Glichrist A. 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 189-196.
- He C, Zhang H, Mirshahi T, Logothetis DE. 1999. Identification of a potassium channel site that interacts with G protein $\beta\gamma$ subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* 274: 12517-12524.
- Hedin, K.E., Lim, N.F., Clapham, D.E. 1996. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of IKACH currents in oocytes. *Neuron* 16:423-429.
- Henry P, Pearson WL, Nichols CG. 1996. Protein kinase C inhibition of cloned inward rectifier (HRK1/ Kir 2.3) K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 495: 681-688.
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels in Excitable Membranes*, 2nd edn. pp.127- 130, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanizirska MV, Hebert SC. 1993. Cloning and expression of an inward rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 362: 31-38.
- Ho IHM, Murrell-Lagnado RD. 1999. Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J of Physiol.* 520: 645-651.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G $\beta\gamma$. *Nature*. 391: 803-806.
- Huang CL, Jan YN, Jan LY. 1997. Binding of the G-protein $\beta\gamma$ subunit to multiple regions of G-protein gated inward rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett.* 405: 291-298.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. 1995. Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$ to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* 15: 1133- 1143.
- Inagaki N, Tsuura YBN, Namba N, Masuda K, Gono T. 1995. Cloning and functional characterization of a novel ATP sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle and heart. *J. Biol. Chem.* 27: 5691-5694.
- Inanobe A, Morishige KI, Takahashi K, Kahano Y, Katada T, Kurachi Y. 1995. G beta gamma directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic K⁺ channel GIRK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 1022-1028.
- Inanobe A, Horio Y, Fujita A, Tanemoto M, Hibino H, Inagada K, Kurachi Y. 1999. Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir 3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J. of Physiol.* 521. 1: 19-30.
- Jan LY, Jan YN. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* 20: 91-123.
- Jelacic TM, Kennedy ME, Wickman K, Clapham DE. 2000. Functional and biochemical evidence of G protein gated

- inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.* **275**: 36211-36216.
- Katada T, Kusakabe K, Oinuma M, UI M. 1987. A novel mechanism for the inhibition of adenylate cyclase via inhibitory GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **262**: 11897- 11900.
- Kehlenbach RH, Mathey J, Huttner WB. 1994. XL alphas is a new type of G proteins. *Nature.* **372**: 804-809.
- Kenna S, Roper J, Ho K, Hebert S, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. 1994. Differential expression of the inwardly rectifying K⁺ channels ROMK1 in rat brain. *Mol. Brain Res.* **24**: 353-356.
- Keren-Raifman T, Bera AK, Zveig D, et al. 2001. Expression level of RGS7 and RGS4 proteins determine the mode of regulation of the G protein-activated K⁺ channel and control regulation of RGS7 by Gβ5. *FEBS. Lett.* **492**: 20-28.
- Kofuji P, Davidson N, Lester HA. 1995. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by Gβγ subunits and function as heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6542-6546.
- Kofuji P, Hofer M, Millen KJ, Millonig JH, Davidson N, Lester HA, Hatten ME. 1996. Functional analysis of the weaver mutant GIRK2 K⁺ channel and rescue of weaver granule cells. *Neuron.* **16**: 941-952.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Velimirovic B, Wickman K, Navaro B, Clapham DE. 1995a. The cardiac inward rectifier K⁺ channel subunit, CIR, does not comprise the ATP-sensitive K⁺ channel. I_{KATP}. *J. Biol. Chem.* **270**: 28777- 28779.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. 1995b. Gβγ binds directly to the G protein gated K⁺ channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* **270**: 29059- 29062.
- Krapivinsky G, Kennedy M, Nemeč J, Medina I, Krapivinsky L, Clapham D. 1998. Gβγ binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation. *J. Biol. Chem.* **273**: 16946– 16952.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K., Velimirovic Clapham DE. 1995c. The protein G gated atrial K⁺ Channels IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺ Channels protein. *Nature* **374**: 135-141.
- Kubo Y, Baldwin E, Jan YN, Jan LY. 1993a. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* **362**: 127-133.
- Kubo Y, Iizuka M. 1996. Identification of domains of the cardiac inward rectifying K⁺ channel, CIR, involved in the heteromultimer formation and in the G-protein gating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**: 240-247.
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. 1993b. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature.* **364**: 802–806.
- Kunkel MT, Peralta EG. 1995. Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell.* **83**: 443-449.
- Kurachi Y. 1995. G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel. *Am. J. Physiol.* **269**: C821- C830.
- Laio YJ, Jan YN, Jan LY. 1996. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J. Neurosci.* **16**: 7137- 7150.
- Leech CA, Stanfield PR. 1981. Inward rectification in frog skeletal muscle fibers and its dependence on membrane potential and external potassium. *J. Physiol (Lond).* **354**: 253-272.
- Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot JP. 1994. Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Lett.* **353**: 37-42.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. 1995. Molecular properties of neuronal G-protein- activated inwardly

rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **270**: 28660-28667.

Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gilman AG. 1990. Purification and characterization of G_o alpha and three types of G_i alpha after expression in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **265**: 8243-8251.

Logothetis DE, Zhang H. 1999. Gating of G protein-sensitive inwardly rectifying K⁺ channel through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Physiol. (London)*. **520**: 630.

Lopatin AN, Makhina AM, Nichols Cg. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanisms of intrinsic rectification. *Nature*. **372**: 366-369.

Lu L, Montrose-Rafizadeh C, Huang TC, Guggino WB. 1990. A delayed rectifier potassium current in Xenopus oocytes. *Biophys. J.* **57**: 1117-1123.

Martinez, M., Salvador, C., Mora, S.I., Gamba, G. and Escobar, L. 1999. Cloning and functional characterization of a Kir3 channel from *Xenopus* oocytes. 43rd. Annual Meeting, Biophysical Journal. Baltimore, Maryland. 13-17 de febrero.

Matsuda A, Sperelakis N. 1993. Inwardly rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **265**: H1107-H1111.

Matsuda H. 1988. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J. Physiol.* **397**: 237-258.

McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. 1996. Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound, glibenclamide, is enhanced by co-expression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 8083-8088.

Miledij R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. (Lond)*. **215**: 491-97.

Milligan G, Parenti M, Magee AI. 1995. The dynamic role of palmitoylation of signal

transduction. *Trends Biochem Sci.* **20**: 181-187.

Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukada Y, Mizuno K, Ohno S, Kozawa O, et al. 1995. Primary structure of a gamma subunit of G protein, gamma 12, and its phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **270**: 29469-29475.

Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. **80**: 249-57.

Nurnberg B, Gudermann T, Schultz G. 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J. Mol. Med.* **73**: 123-132.

Ohmori H. 1978. Inactivation kinetics and steady state current noise in the anomalous rectifier of the tunicate egg cell membrane. *J. Physiol.* **281**: 77-79.

Parker I, Ivorra I. 1990. A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **238**: 369-381.

Parker I, Miledi R. 1987b. Tetrodotoxin-sensitive sodium currents in native *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal. Soc. Lond.* **B232**: 289-296.

Parker I, Miledi R. 1988. Calcium-independent chloride current activated by Hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 6240-6244.

Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM, Graham D. 1998. Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett.* **434**: 171-176.

Perier F, Radeke CM, Vandenberg CA. 1994. Primary structure and characterization of a small conductance inwardly rectifier potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 6240-6244.

Petit-Jacques J, Sui LS, Logothetis DE. 1999. Synergistic activation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the

β subunits of G proteins and Na^+ and Mg^{2+} ions. *J. Gen. Physiol.* **114**: 673-684.

Philipson LH, Kuznetsov A, Toth PT, Murphy JF, Szabo G, Ma GH, Miller RJ. 1995. Functional expression of an epitope-tagged G protein-coupled K^+ channel (GIRK1). *J. Biol. Chem.* **270**: 14604-14610.

Raab-Graham KF, Radeke CM, Vanderberg CA. 1994. Molecular cloning and expression in the human heart inward rectifier K^+ channel. *Neuroreport*. **5**: 2501-2505.

Ray K, Kunsch C, Bonner LM, Robishaw JD. 1995. Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10 and gamma 11 subunits. *J. Biol. Chem.* **270**: 21765-21771.

Ruppertsberg JP. 2000. Intracellular regulation of inward rectifier K^+ channels. *Pflugers Arch- Eur J. Physiol.* **441**: 1- 11.

Sakmann B, Trube G. 1984. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.* **387**: 227-250.

Salvador, C., Martínez, M., Mora, SI., Egido, W., Farias, JM., Gamba, G., and Escobar, LI. 2001. Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1512**: 135-147.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd. Edition, CHS. No. 1, 2, 3.

Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS. 1994. Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROMK-K potassium channel. *J. Biol. Chem.* **269**: 24261-24270.

Slesinger PA, Reuveny E, Jan YN, Jan LY. 1995. Identification of structural elements involved in G proteins gating of the GIRK1 potassium channel. *Neuron*. **15**: 1145- 1156.

Spauschus A, Lentjes KU, Wischmeyer E, Dissmann E, Karschin C, Karschin A. 1996. A G-protein-activated inwardly rectifying K^+

channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *J Neurosci.* **16**: 930-938.

Standen NB, Standfield PR. 1978. A potential and time dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibers by barium and strontium ions. *J. Physiol.* **280**: 169-191.

Sui JL, Petit-Jacques J, Logothetis DE. 1998. Activation of the atrial K_{ACh} channel by the β subunits of G protein or intracellular Na^+ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1307-1312.

Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. 1996. Muscarine-gated K^+ channel: subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am. J. Physiol.* **271**: H379- H385.

Vaughan M. 1998. G protein-coupled receptors minireview series. *J. Biol. Chem.* **273**: 17297.

Velimirovic BM, Gordon EA, Lim NF, Navarro B, Clapham DE. 1996. The K^+ channel inward rectifier subunits from a channel similar to neuronal G protein-gated K^+ channel. *FEBS Lett.* **379**: 31-37.

Vivaudou M, Chan KW, Sui JL, Jan YL, Reuveny E, Logothetis DE. 1997. Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of the K_{ACh} channel, using functional homomeric mutants. *J. Biol. Chem.* **272**: 31553- 31560.

Voet D, Voet JG. 1995. Biochemistry. 2nd. Edition. John Wiley and Sons, Inc. USA. 508-509 pag.

Whaler GM. 1992. Developmental increases in the inwardly rectifying K^+ current of rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **262**: C1266- C1272.

Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Tagliatela M, Brown AM. 1995. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K^+ channels from human atrium. *Circulation Res.* **76**: 343-350.

Wickman KD, Iniguez-Lluhi JA, Davenport PD, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. 1994. Recombinant G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature*. **368**: 255-257.

Xu ZC, Yanf Y, Hebert SC. 1996. Phosphorylation of the ATP sensitive inwardly rectifying K^+ channel, ROMK, by cyclic AMP dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 9313-9319.

Yang XC, Sachs F. 1990. Characterization of stretch-activated ions channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond)*. **431**: 103-122.

Zhang H, He C, Yan X, Mirs hahi T, Logothetis DE. 1999. Activation of inwardly rectifying K^+ channel by distinct PtdIns (4,5) P2 interactions. *Natl. Cell. Biol.* **3**: 183-188.

Zhou H, Tate SS, Palmer LG. 1994. Primary structure and functional properties of an epithelial K^+ channel. *Am. J. Physiol.* **266**: C809-C824.

XI. APENDICE DE PROTOCOLOS

Medio LB para bacterias

Para preparar 1 litro agregar:

10 g de bacto triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de NaCl

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave 20 min. Guardar a temperatura ambiente. Si se necesita medio con antibiótico agregar ampicilina a una concentración final de 100 ug/ ml

Cajas de LB/agar:

Agregar 7 g de agar por 1 l de medio LB. Esterilizar en autoclave 20 min dejar enfriar aprox. a 50 °C . Vaciar 20 ml de este medio/ caja de petri de 10 cm., esperar a que solidifique el agar y guardar a 4 °C. Si se necesitan cajas con ampicilina, una vez que el medio se encuentra a 50 °C agregar ampicilina a una concentración final de 100 ug/ ml

Buffer TBE para gel de agarosa

Para preparar 1 l de un stock 5X agregar:

54 g de Tris-base

27.5 g de ácido bórico

20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

Diluir esta solución 5 veces para tener el buffer 1X para preparar y correr el gel

Buffer de corrida para muestras de DNA

Azul de bromofenol 0.25 %

Xileno cianol FF 0.25 %

Glicerol en agua 30 %

Guardar 4 °C

Gel de agarosa al 1 % para correr muestras de DNA

Pesar 0.3 g de agarosa, agregar 30 ml de buffer TBE 1X

Calentar por 1 min en el horno de microondas. Esperar a que se enfíe un poco

Agregar 1.4 ml de solución de bromuro de etidio (10 mg/ ml)

Agitar un poco y vaciarlo en la cámara de electroforesis para que solidifique

Cargar 10 ul de cada muestra de DNA con buffer de corrida

Correr a 70 mV por 45 min

Purificación de DNA a partir del gel de agarosa

(Concert gel extraction system)

Mantener un baño maría a 50 y otro a 65 °C

Reactivos:

- Buffer de solubilización del gel (L1 con: perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio y TBE- solubilizador)
- Buffer de lavado (L2 con: NaCl, EDTA y Tris-HCl)
- Buffer TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)

Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

Antes de empezar: Precalentar una alícuota de buffer TE de 65 a 70 °C.

Equilibrar un baño maría o termoblock a 50 °C. Verificar que el etanol ha sido adicionado al buffer de lavado (L2)

1.- Cortar la rebanada del gel que contiene el fragmento de DNA usando una navaja limpia y filosa.

2.- Pesar la rebanada de gel. Para geles de agarosa al 2%, colocar 400 mg de gel en un tubo de polipropileno de 1.5 ml. Agregar 30 l de gel solubilizador (L1) por cada 10 mg de gel.

3.- Solubilización de geles. Incubar a 50 °C por 15 min. Mezclar cada 3 minutos para asegurar que el gel se disuelva. Una vez que la rebanada de gel parece estar disuelta, se requiere de un período adicional de incubación de 5 minutos a 50 °C.

- 4.- Cargado de la columna. Colocar una columna en un tubo de lavado de 2 ml. Pipetear la mezcla del paso 3 en la columna. Centrifugar a 12 000 X g por 1 min. Eliminar el volumen eluido.
- 5.- (Lavado opcional de la columna). Colocar la columna nuevamente en el tubo de lavado. Agregar 500 µl de buffer L1 a la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min. y centrifugar a 12 000 X g por 1 min. Eliminar el volumen eluido.
- 6.- Lavado de la columna. Colocar la columna nuevamente en el tubo de lavado. Agregar 700 µl del buffer de lavado L2 (con ETOH) a la columna e incubar a temperatura ambiente por 5 min. y centrifugar a 12 000 X g por 1 min. Eliminar el volumen eluido. Centrifugar nuevamente por un minuto y eliminar el buffer de lavado residual.
- 7.- Elución del DNA. Colocar la columna dentro de un tubo de recuperación. Agregar 50 µl de buffer TE caliente directamente al centro de la columna. Incubar por un min. a temperatura ambiente y centrifugar a 12 000 X g por 2 min..

Preparación de células competentes

- 1.- Incubar 5 ml de medio LB con una colonia bacteriana DH5α, o con 10 µl del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación constante
- 2.- Incubar 20 ml de medio LB con 0.2 ml del cultivo bacteriano del paso 1, a 37 °C con agitación constante
- 3.- Crecer las bacterias hasta que alcancen una O. D. Entre 0.3 y 0.5 (aprox. 3 h)
- 4.- Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C en un tubo estéril
- 5.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 ml de solución A fría. Llevar las células a un volumen final de 10 ml con la solución A y centrifugar como en el paso 4. Decantar el sobrenadante
- 6.- Resuspender el botón en 1 ml de solución B fría. Llevar a un volumen final de 10 ml con la solución B
- 7.- Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células como en el paso 4
- 8.- Decantar el sobrenadante. Secar el tubo lo más que se pueda
- 9.- Muy suavemente resuspender las bacterias en 2 ml de solución B

10.- Hacer alicuotas de 200 μ l y agregar 10 % de glicerol estéril. Mezclar muy suavemente por inversión. Congelar estos stocks en hielo seco y almacenar a -70 $^{\circ}$ C por varios meses

Estas soluciones se preparan un día antes y se filtran antes de ser utilizadas:

Solución A

Cloruro de rubidio 10 mM

MOPS 10 mM pH 7.0

Solución B

Cloruro de rubidio 10 mM

Cloruro de calcio 50 mM

MOPS 100 mM pH 6.5

Transformación

- 1.- Mezclar 200 μ l de células competentes con 0.05- 0.5 μ g de DNA del plásmido
- 2.- Incubar sobre hielo 30 min
- 3.- Dar un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C por 2 min
- 4.- Enfriar las células por unos segundos sobre hielo
- 5.- Agregar 1 ml de LB sin antibiótico. Resuspender por inversión
- 6.- Incubar a 37 $^{\circ}$ C por una hr
- 7.- Centrifugar a 2500 rpm a 4 $^{\circ}$ C por 5 min
- 8.- Decantar el sobrenadante
- 9.- Agregar 200 μ l de LB y resuspender muy suavemente
- 10.- Plaquear estos 200 μ l de bacterias en una caja de LB/agar/ ampicilina
- 11.- Incubar a 37 $^{\circ}$ C toda la noche
- 12.- Verificar el crecimiento de colonias

Minipreparación de DNA por el método de lisis alcalina

- 1.- Inocular 4 ml de medio LB/ampicilina y la colonia bacteriana correspondiente. Incubar a 37 $^{\circ}$ C toda la noche

- 2.- Tomar 0.5 ml del cultivo bacteriano (en esterilidad) y agregar 50 μ l de glicerol estéril. Guardar el stock de glicerol a -70°C . Centrifugar los 3.5 ml de medio restantes a 5000 rpm durante 5 min
- 3.- Resuspender el botón en 100 μ l de sol. I. Transferir a un tubo eppendorf e incubar 5 min a temperatura ambiente
- 4.- Agregar 200 μ l de sol. II fresca e incubar 5 min sobre hielo
- 5.- Agregar 150 μ l de solución III e incubar 10 min sobre hielo
- 6.- centrifugar a 14 000 rpm por 10 min y a 4°C . Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
- 7.- Agregar 1/10 (40 μ l) de volumen de 1M tris-HCl pH 8.0
- 8.- Agregar 1 volumen de fenol/cloroformo
- 9.- Vortex por 15 seg
- 10.- Centrifugar como en el paso 6 por 5 min. Recuperar la fase de arriba en un tubo eppendorf nuevo
- 11.- Repetir del paso 8 al .10
- 12.- Agregar 2 $\frac{1}{2}$ volúmenes de etanol frío al 100 %
- 13.- Incubar a -80°C 15 min (opcional toda la noche)
- 14.- Centrifugar como en el paso 6. Decantar el sobrenadante y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 80 %. Volver a centrifugar
- 15.- Secar el botón lo más que se pueda
- 16.- Resuspender el botón en 40 μ l de agua BM o buffer TE

Solución I

Glucosa 50 mM

Tris-HCl pH 8.0 25 mM

EDTA pH 8.0 10 mM

Preparar 100 ml y esterilizar 15 min en autoclave, guardar a 4°C

Solución II

Para preparar 2 ml agregar:

400 μ l de una solución 1M de NaOH

200 μ l de una solución 10 % de SDS
1.4 ml de agua BM

Solución III

Para preparar 100 ml de solución agregar:

60 ml de acetato de potasio 5M

11.5 ml de ácido acético glacial

28.5 ml de agua BM

El resultado final es 3 M de K^+ y 5 M de acetato. Guardar a temperatura ambiente

Maxipreparación de DNA con las columnas de QIAGEN

- 1.- Inocular 500 ml de medio LB con 100 μ l del stock de bacterias en glicerol. Incubar a 37 °C toda la noche , con agitación constante
- 2.- Centrifugar 10 min a 5000 rpm
- 3.- Resuspender en 10 ml de buffer P1
- 4.- Agregar 10 ml de buffer P2, mezclar por inversión (6 veces) e incubar 5 min a temperatura ambiente
- 5.- Agregar 10 ml de buffer P3 frío, mezclar por inversión (6 veces). Incubar 20 min sobre hielo
- 6.- Mezclar por inversión. Centrifugar 30 min a 16 000 rpm y a 4 °C. Recuperar el sobrenadante
- 7.- Repetir el paso 6 durante 15 min o filtrar el sobrenadante a través de una gasa estéril antes de pasarlo por la columna
- 8.- Equilibrar la columna Qiagen-tip 500 con 10 ml de buffer QBT
- 9.- Pasar el sobrenadante por la columna
- 10.- Lavar la columna con 30 ml de buffer QC (2 veces)
- 11.- Eluir el DNA con 15 ml de buffer QF
- 12.- Precipitar con 0.7 volúmenes de isopropanol (10.5 ml) a temperatura ambiente. Centrifugar a 16 000 rpm por 30 min a 4 °C
- 13.- Lavar el botón con 15 ml de etanol al 70 %

14.- Secar muy bien el botón y resuspender en agua BM (500 µl aprox.) o en buffer TE. Guardar a -20 °C

Extracción de RNA total por el método de TRIZOL

- 1.- Agregar 1 ml de solución de trizol por caja de petri de 10 cm con las células correspondientes. Incubar 5 min a temperatura ambiente. Raspar las células y transferirlas a un tubo eppendorf. En esta solución se pueden guardar por lo menos 1 mes a - 70 °C.
- 2.- Agregar 200 µl de cloroformo, agitar vigorosamente 15 seg (con la mano)
- 3.- Incubar 3 min a temperatura ambiente
- 4.- Centrifugar a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C. Tomar la fase acuosa (la de arriba) y transferirla a un nuevo tubo eppendorf
- 5.- Agregar 500 µl de isopropanol y agitar brevemente con el vortex
- 6.- Incubar 10 min a temperatura ambiente
- 7.- Centrifugar a no más de 12 000 rpm 10 min a 4 °C (botón gelatinoso)
- 8.- Lavar el botón con 1 ml de etanol al 75 %
- 9.- Centrifugar a no más de 7500 rpm por 5 min a 4 °C
- 10.- Secar el botón de 5-10 min al aire
- 11.- Resuspender el botón en 30 µl de agua BM. Guardar a - 70 °C

Preparación del Medio Grace's para células de insecto

Para preparar un litro de este medio:

- Disolver un sobre de medio grace's en polvo (SIGMA) en 700 ml de agua destilada
- Agregar:
 - 0.35 g de bicarbonato de sodio (SIGMA)
 - 20 ml de lactoalbumina hidrolisada (GIBCO BRL)
 - 20 ml de yeastolate (GIBCO BRL)
 - 100 de suero bovino fetal inactivado (GIBCO BRL)
 - 10 ml de antibiótico antimicótico (GIBCO BRL)
- Ajustar el pH a 6.2

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Aforar a 1 l
- Filtrar con un filtro de 0.22 μm
- Guardar a 4 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad

Para las células de insecto que crecen en medio líquido se agregan 10 ml de plurónico F-68 por cada litro de medio.