



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LA ACTIVACION DE UN CANAL GIRK5

*El Papel de la Fosforilación de Tirosinas en la  
Expresión Funcional del Canal GIRK5*

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

***DOCTORA EN CIENCIAS***

PRESENTA

***M. en C. Silvia Ivonne Mora Herrera***



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El trabajo presentado se realizó en el Departamento de fisiología de la Facultad de medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Laura Escobar Pérez.

El apoyo financiero para la realización del trabajo experimental corrió a cargo de DGAPA (IN220199) y CONACYT (30570 y 41365).

# Índice general

<i>Capítulo</i>	<i>Pag.</i>
<i>1. Resumen</i>	1
<i>2. Introducción</i>	2
<i>3. Canales de potasio</i>	3
<i>3.1. El Poro de los canales de potasio.</i>	3
<i>3.2. Clasificación de los canales de potasio.</i>	5
<i>3.2.1. Canales de potasio con cuatro y ocho segmentos transmembranales.</i>	6
<i>3.2.2. Canales de potasio con seis y siete segmentos transmembranales.</i>	8
<i>3.2.3. Canales de potasio con dos segmentos transmembranales.</i>	9
<i>4. Los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir).</i>	10
<i>4.1. Clasificación de los canales Kir.</i>	11
<i>4.1.1. La subfamilia Kir 1.x (ROMK).</i>	13
<i>4.1.2. La subfamilia Kir 2x (IRK).</i>	15
<i>4.1.3. La subfamilia Kir 3 (GIRK).</i>	16
<i>4.1.4. La subfamilia Kir 4 y Kir 5.</i>	16
<i>4.1.5. La subfamilia Kir 6 (KATP).</i>	18
<i>4.1.6. La subfamilia Kir 7.</i>	19
<i>4.2. Rectificación entrante</i>	21
<i>4.3. Características de los canales Kir 3 (GIRK).</i>	23
<i>4.3.1. Activación de los canales GIRK por proteínas G.</i>	26
<i>4.3.2. Modulación independiente de las proteínas G</i>	32
<i>4.2.2.1. Modulación dependiente de PIP<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> ATP.</i>	32
<i>4.2.2.2. Modulación de os canales GIRK por agentes oxido-reductores.</i>	34
<i>5. Antecedentes.</i>	36
<i>5.1. El Canal GIRK5.</i>	36
<i>6. El papel de la fosforilación en los canales de potasio.</i>	39
<i>6.1. Regulación de los canales de potasio por proteína cinasa A y C.</i>	39

<b>Capítulo</b>	<b>Pag.</b>
<b>6.2. Regulación de los canales de potasio por cinasas de tirosinas.</b>	42
<b>6.2.1. Efecto de las PTKs en los canales Kv.</b>	42
<b>6.2.2. Reguación de los canales Kir PTKs.</b>	45
<b>6.2.2.1. La subfamilia Kir 1.</b>	45
<b>6.2.2.2. La subfamilia Kir 2.1.</b>	46
<b>6.2.2.3. La subfamilia Kir 3 (GIRK).</b>	47
<b>7. Planteamiento del problema.</b>	49
<b>8 Hipótesis</b>	50
<b>9. Objetivos.</b>	51
<b>9.1. Objetivo general.</b>	51
<b>9.2. Objetivos particulares.</b>	51
<b>10. Métodos</b>	52
<b>10.1. Obtención de los diferentes ADNs utilizados</b>	53
<b>10.1.1. Obtención del ADN de los canales GIRK5, <math>\Delta 5</math>GIRK5 y <math>\Delta 25</math>GIRK5.</b>	53
<b>10.1.2. Ligación al vector PBF.</b>	53
<b>10.1.3. Construcción del DNAc de las proteínas de fusión con la EGFP</b>	54
<b>10.2. Transformación.</b>	54
<b>10.3. Secuenciación</b>	54
<b>10.4. Transcripción in vitro.</b>	54
<b>10.5. Expresión de los canales en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i>.</b>	55
<b>10.5.1. Obtención de los ovocitos.</b>	55
<b>10.5.2. Microinyección.</b>	55
<b>10.6. Registros electrofisiológicos.</b>	55
<b>10.7. Microscopía confocal.</b>	56
<b>10.8. Ensayos de inhibición de las proteínas cinasas de tirosinas endógenas de los ovocitos.</b>	56
<b>10.9. Detección de las proteínas de fusión con la técnica de Western Blott</b>	57
<b>10.10. Análisis estadístico</b>	57

<b>Capítulo</b>	<b>Pag.</b>
<b>11. Resultados y discusión.</b>	58
<b>11.1. Expresión funcional de las isoformas del canal GIRK5</b>	58
<b>11.1.2. Coexpresión de los canales GIRK5 y <math>\Delta 25</math>GIRK5.</b>	77
<b>11.2. Efecto de la fosforilación de la tirosina 16 (Y16) en la expresión funcional de los canales GIRK5.</b>	63
<b>11.2.1 Efecto de la mutación de la Y16 por alanina en los canales GIRK5.</b>	64
<b>11.2.2. Efecto de dos inhibidores de cinasas de tirosinas sobre la función de los canales GIRK5.</b>	65
<b>11.2.3. La fosforilación de la Y16 en los canales GIRK5 impide su expresión a nivel de la membrana.</b>	67
<b>11.2.3.1. Expresión de las proteínas de fusión con la EGFP.</b>	67
<b>11.2.3.2. Efecto de la geldanamicina en la expresión funcional de los canales EGFP-GIRK5.</b>	70
<b>11.2.3.3. Inmunodetección de los canales en la membrana plasmática.</b>	71
<b>11.3. Propiedades de los canales GIRK5.</b>	75
<b>11.3.1. Bloqueo de la corriente en los canales GIRK5Y16A y <math>\Delta 25</math>GIRK5 por <math>Ba^{2+}</math> externo.</b>	75
<b>11.3.2. Activación de los canales GIRK5 a través del receptor AChm<sub>2</sub>.</b>	77
<b>11.3.3. Estudio de los heterotetrámeros del canal GIRK5 con el canal GIRK1.</b>	80
<b>11.3.3.1. Comparación de la actividad basal en los heterotetrámeros.</b>	81
<b>11.3.3.2. Comparación de la actividad de los heterotetrámeros mediada por el receptor AChm<sub>2</sub>.</b>	83
<b>11.4. Las proteínas endógenas G<math>\beta\gamma</math> libres activan a los canales GIRK5.</b>	86
<b>11.5. Los canales GIRK5 en los ovocitos.</b>	88
<b>12. Conclusiones.</b>	91
<b>13. Perspectivas.</b>	93
<b>14. Literatura citada.</b>	95
<b>Apéndice A: Técnicas</b>	112
<b>Apéndice B: Artículos publicados.</b>	118

<i>Indice de esquemas</i>	<i>Pag.</i>
<i>1. La región del poro de los canales de potasio.</i>	4
<i>2. Topología de los canales de potasio.</i>	6
<i>3. Topología de las subunidades alfa de los canales de potasio con dos regiones P.</i>	7
<i>4. Topología de los canales de potasio con seis y siete segmentos transmembranales.</i>	8
<i>5. Topología de los canales Kir.</i>	10
<i>6. La corriente de los canales Kir.</i>	11
<i>7. Arbol filogenético de los canales Kir.</i>	13
<i>8. El canal Kir 1.1.</i>	14
<i>9. Curva I-V del canal Kir 2.1.</i>	16
<i>10. Efecto de la proteína PSD95 en la expresión de los canales Kir 5.1.</i>	17
<i>11. Topología del canal KATP.</i>	19
<i>12. Efecto de la concentración de K<sup>+</sup> externo en los canales Kir.</i>	21
<i>13. Un aspartato en M2 es responsable de la rectificación entrante.</i>	22
<i>14. La corriente IK<sub>ACh</sub>.</i>	24
<i>15. Activación de los canales GIRK por el dímero Gβγ.</i>	25
<i>16. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G.</i>	27
<i>17. Vía de señalización de las proteínas Gα<sub>i</sub>/Gα<sub>o</sub>.</i>	28
<i>18. Ciclo de activación de los canales GIRK por las proteínas G.</i>	30
<i>19. Moduladores de los canales GIRK.</i>	31
<i>20. Activación de los canales GIRK por Mg<sup>2+</sup> ATP.</i>	33
<i>21. Modelo de la activación de los canales GIRK por PIP2.</i>	34
<i>22. La corriente de K<sup>+</sup> rectificadora entrante de los ovocitos de la rana Xenopus.</i>	36
<i>23. Región inicial de la secuencia del ADN del gen del canal GIRK5.</i>	38
<i>24. Las isoformas del canal GIRK5.</i>	39
<i>25. Efecto de la PKA en la corriente IK<sub>ACh</sub>.</i>	40
<i>26. Efecto de la proteína Src en los canales hKv1.5.</i>	43
<i>27. Efecto de la tirosina cinasa Src en los canales Kv 7 (KCNQ).</i>	44
<i>28. Modelo del efecto de la ingestión de potasio en los canales Kir 1.1.</i>	46
<i>29. Efecto del perortovanadato de Na<sup>+</sup> en el canal Kir 2.1.</i>	47
<i>30. Efecto de la fosforilación de tirosinas en los canales Kir 3 (GIRK).</i>	48
<i>31. Métodos.</i>	52

<b>Indice de figuras</b>	<b>Pag.</b>
1. <i>Expresión de los canales GIRK5.</i>	59
2. <i>Efecto de la concentración de K<sup>+</sup> externo en el canal <math>\Delta 25</math>GIRK5.</i>	60
3. <i>Efecto de la cantidad de ARNc de los canales GIRK5.</i>	61
4. <i>Efecto de la coexpresión de los canales GIRK5 y <math>\Delta 25</math>GIRK5.</i>	62
5. <i>Expresión funcional de los canales mutantes.</i>	64
6. <i>Efecto de dos inhibidores de cinasas de tirosinas en los canales GIRK5.</i>	67
7. <i>Expresión de las proteínas de fusión con la EGFP.</i>	69
8. <i>Efecto de la genisteína en la proteína de fusión EGFP-GIRK5.</i>	70
9. <i>Inmunodetección de las proteínas de fusión en la fracción membranal.</i>	72
10. <i>Alineamiento de la secuencia de aminoácidos en la región amino terminal de los canales GIRK.</i>	74
11. <i>Bloqueo de la corriente de los canales GIRK5 por Ba<sup>2+</sup> externo.</i>	77
12. <i>Activación de la corriente de los canales GIRK5 mediada por el receptor AChm<sub>2</sub>.</i>	79
13. <i>Efecto de la coexpresión del receptor AChm<sub>2</sub> en la actividad basal de los heterotetrámeros.</i>	82
14. <i>Comaparación de la corriente mediada a través de la activación del receptor AChm<sub>2</sub> en los heterotetrámeros.</i>	85
15. <i>Efecto de la coexpresión de la proteína G<math>\alpha</math>2 en la corriente de los canales GIRK5Y16A y <math>\Delta 25</math>GIRK5.</i>	87

<b>Indice de tablas</b>	<b>Pag.</b>
1. <i>Concentraciones típicas de los iones más importantes en las células de mamífero.</i>	3
2. <i>Sensibilidad de los canales Kir al Ba<sup>2+</sup> externo.</i>	20
3. <i>Secuencia de los iniciadores sentido y antisentido utilizados.</i>	53
4. <i>Efecto de dos inhibidores de PTKs sobre la corriente basal de los canales GIRK5.</i>	65
5. <i>Efecto de la coexpresión del receptor AChm<sub>2</sub> en la corriente basal de los homotetrámeros de GIRK5.</i>	80
6. <i>Comparación de la actividad de los heterotetrámeros coexpresados con el receptor muscarínico AChm<sub>2</sub>.</i>	83



## 1. Resumen.

Los canales de potasio controlan el potencial de membrana en reposo y la fase de repolarización y la frecuencia del potencial de acción en las células excitables. La familia de los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir) establecen el valor del potencial de membrana en reposo. En particular, la subfamilia Kir 3 se activa por hormonas y neurotransmisores como la somatostatina, la acetilcolina (ACh) y la adenosina, a través de la estimulación de los receptores acoplados a las proteínas G. Por esta razón reciben el nombre de canales de potasio activados por proteínas G o GIRK.

Los canales GIRK comprenden cinco isoformas (GIRK1-5). Los canales del GIRK1 al GIRK4 se clonaron a partir de células de mamíferos y el canal GIRK5 de anfibios. Los canales GIRK forman heterotetrámeros funcionales compuestos de la subunidad GIRK1 con cualquier otra subunidad GIRK (GIRK2-4).

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* expresan el canal de potasio GIRK5. El gen del canal GIRK5 puede dar lugar a tres isoformas, GIRK5,  $\Delta 5$ GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5, de los cuales únicamente la isoforma más corta, la  $\Delta 25$ GIRK5, forma homotetrámeros funcionales. A partir de estos resultados surgió la pregunta: ¿Por qué sólo la isoforma más corta es funcional? Los canales GIRK5 y  $\Delta 5$ GIRK5 poseen un residuo de tirosina (Y16), dentro de una secuencia de fosforilación. Existen evidencias, en otros canales de  $K^+$ , que la fosforilación de un residuo de tirosina regula la expresión del canal, alterando con ello las propiedades fisiológicas de las células excitables. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fosforilación de un residuo de tirosina (Y16) en la expresión funcional de los canales GIRK5. Nuestro estudio brinda la primera evidencia de que la fosforilación endógena de una tirosina en la región amino terminal regula el tráfico de los canales GIRK5 a la membrana plasmática y en consecuencia, su expresión funcional.

## 2. Introducción.

La membrana plasmática es impermeable a los iones y a las moléculas polares. El paso de los iones en las células se lleva a cabo por proteínas especializadas como son las bombas, los transportadores y los canales iónicos. Los canales iónicos permiten el paso selectivo de hasta  $10^9$  iones por segundo [Adley y Stanfield 1998]. Hay familias de canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y de cloruros ( $\text{Cl}^-$ ). La difusión de los iones a través de los diversos canales iónicos es pasiva, es decir, se realiza a favor de su gradiente electroquímico [Hille 2001, Berg *et al.* 2002].

Además de la selectividad iónica, los mecanismos que provocan su apertura distinguen a los diferentes tipos de canales iónicos. Algunos se abren después de interactuar con moléculas específicas como los neurotransmisores o los mensajeros citoplasmáticos (canales dependientes de ligando), mientras que otros se abren en respuesta a cambios en el voltaje de la membrana (dependientes de voltaje). Su función se ha relacionado ampliamente con la regulación del potencial de membrana y los fenómenos de excitabilidad eléctrica celular como son: la integración neuronal, el ritmo cardiaco y la locomoción, entre otros [Aidley y Standfield 1998, Ashcroft 2000]. Los canales iónicos se clasifican tomando como base el tipo de ión que difunden y el estímulo que causa su apertura [Hille 2001, Berg *et al.* 2002].

De los diferentes iones que juegan un papel importante en la célula (Tabla 1), el ión potasio ( $\text{K}^+$ ) es el catión cuya concentración es más abundante en el medio intracelular respecto al extracelular. Este catión es de suma importancia en el establecimiento del potencial de membrana en reposo. Julius Bernstein (1902, 1912) fue uno de los pioneros en observar que la membrana de las células en reposo es selectivamente permeable al  $\text{K}^+$ , y durante la excitación la permeabilidad de la membrana a otros iones se incrementa [Bolsover *et al.* 2004]. Por lo tanto, el potencial de membrana para una célula en reposo es muy cercano al potencial de equilibrio para el ión potasio.

**Tabla1:** Concentraciones típicas de los iones más importantes en las células de mamífero.

Ión	Citosol	Medio extracelular
Na <sup>+</sup>	10 mM	150 mM
K <sup>+</sup>	140 mM	5 mM
Ca <sup>2+</sup>	100 nM	1 mM
Cl <sup>-</sup>	5 mM	100 mM

Tomado de Bolsover *et al.* 2004

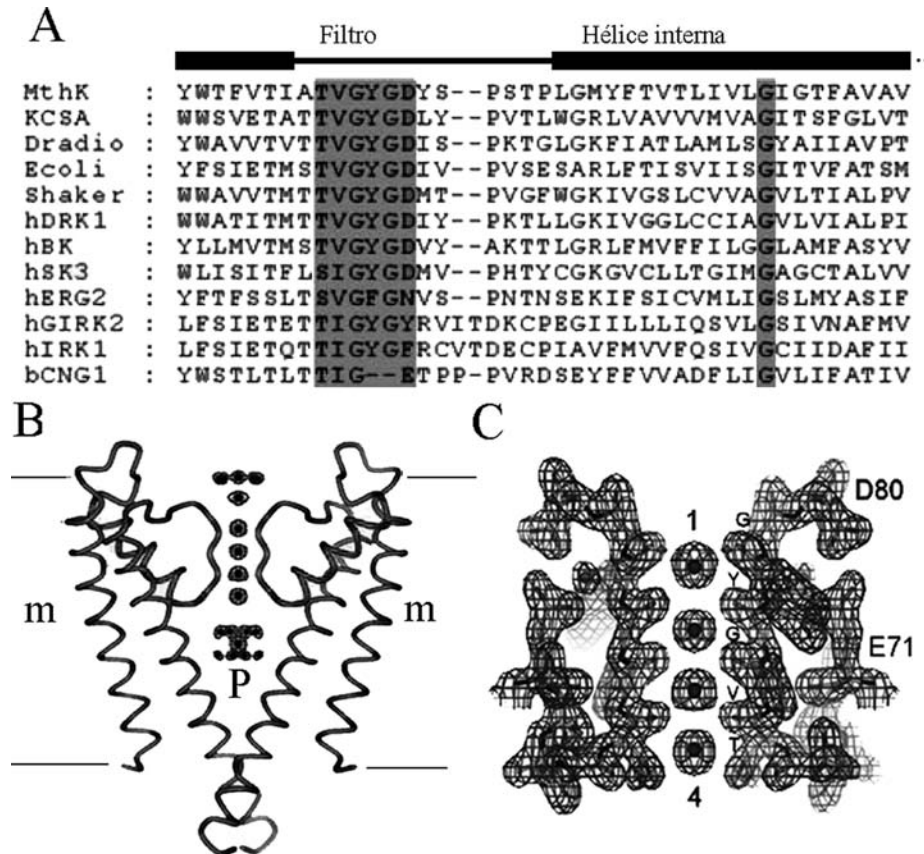
### 3. Canales de potasio.

Los canales de potasio son un grupo de proteínas ubicuas extremadamente diversas. La mayoría de las células que han sido analizadas con las técnicas electrofisiológicas expresan, al menos, un tipo de corriente de K<sup>+</sup> [Hille 2001]. El potencial de la membrana en reposo es muy cercano al potencial de equilibrio para el ión K<sup>+</sup> debido a que hay canales de potasio abiertos. Los canales de K<sup>+</sup> regulan varios procesos celulares como son el volumen celular, la liberación de hormonas y neurotransmisores, el potencial de reposo celular y la excitabilidad celular [Hille 2001].

#### 3.1. El poro de los canales de potasio.

A pesar de que el radio atómico del K<sup>+</sup> es de 1.33 Å y el del Na<sup>+</sup> es de 0.95 Å, los canales de potasio seleccionan el paso de los iones K<sup>+</sup> sobre los del Na<sup>+</sup> por un factor de más de 1000 [Doyle *et al.* 1998]. Los canales de potasio se conforman por cuatro subunidades alfa que contienen una región altamente conservada que forma el poro (P, Esquema 1). Dentro del poro hay una secuencia de aminoácidos (TVGYG) altamente conservada que se denomina el filtro de selectividad [Ruppertsberg *et al.* 1991 Mackinnon 1991, Heginbotham y Mackinnon 1992,

Mackinnon *et al.* 1993, Heginbotham *et al.* 1994]. Estos residuos favorecen el paso de los iones  $K^+$  sobre los del  $Na^+$ .



**Esquema 1.** La región del poro de los canales de potasio. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos en la región del poro y de la hélice interna de algunos canales de potasio. Sombreados se encuentran los aminoácidos que contribuyen al filtro de selectividad. B) Dos de las cuatro subunidades del canal de potasio KcsA. La hélice interna es la que esta en estrecha relación con la la región del poro (P) y la hélice externa se encuentran embebidos en la membrana (m). El filtro de selectividad se localiza en la región central y esta unida a una pequeña alfa hélice.[A y B modificados de Mackinnon 2003] C) Región del filtro de selectividad con cuatro iones  $K^+$  rodeados de agua [Modificado de Zhou y Mackinnon 2003].

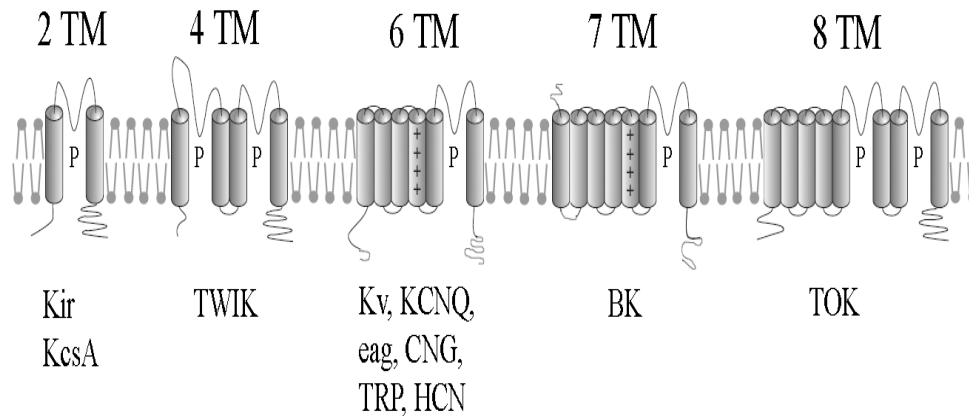
En 1998 se publicó la primera estructura de rayos X de un canal de potasio de *Streptomyces lividans* el canal KscA [Doyle *et al.* 1998]. Cada subunidad del canal KscA posee dos segmentos transmembranales con una estructura de  $\alpha$ -hélice (Esquema 1A y B). Se observa una hélice interna localizada en la cercanía del poro y una hélice externa cerca de la membrana (Esquema 1A y B). Estos estudios muestran que en el filtro de selectividad los iones potasio se distribuyen en cuatro sitios de unión referidos del 1 al 4 (Esquema 1C) [Doyle *et al.* 1998, Zhou y Mackinnon 2003, Mackinnon 2003].

El filtro de selectividad es de suma importancia en los canales de potasio para poder discernir entre los iones  $K^+$  y  $Na^+$ . Existe una gran diversidad de canales de potasio con propiedades farmacológicas y topológicas únicas. A continuación se describirá la clasificación de los canales de potasio tomando como base su topología.

### **3.2. Clasificación de los canales de potasio.**

Los canales de potasio se encuentran compuestos de subunidades alfa ( $\alpha$ ) y, en algunos casos, se acompañan de subunidades beta ( $\beta$ ) (Esquema 2). La subunidad  $\alpha$  es la responsable de la conducción iónica, atraviesa la bicapa lipídica y contiene la región del poro (P) con su filtro de selectividad [Heginbotham *et al.* 1994]. La subunidad  $\beta$  modula algunas propiedades biofísicas de los canales como son la cinética de la corriente, la probabilidad de apertura y pueden modular la expresión de las subunidades  $\alpha$  en la membrana [Biggin *et al.* 2000].

En relación con la topología de la subunidad  $\alpha$  podemos encontrar canales de potasio con dos, cuatro, seis, siete y ocho segmentos transmembranales (Esquema 2), los cuales se describirán brevemente a continuación.



**Esquema 2.** *Topología de los canales de potasio.* Se muestra la diversidad de las subunidades  $\alpha$  respecto al número de los segmentos transmembranales, las regiones del poro (P) que presentan y la familia a la que pertenecen. TM se refiere a los segmentos transmembranales.

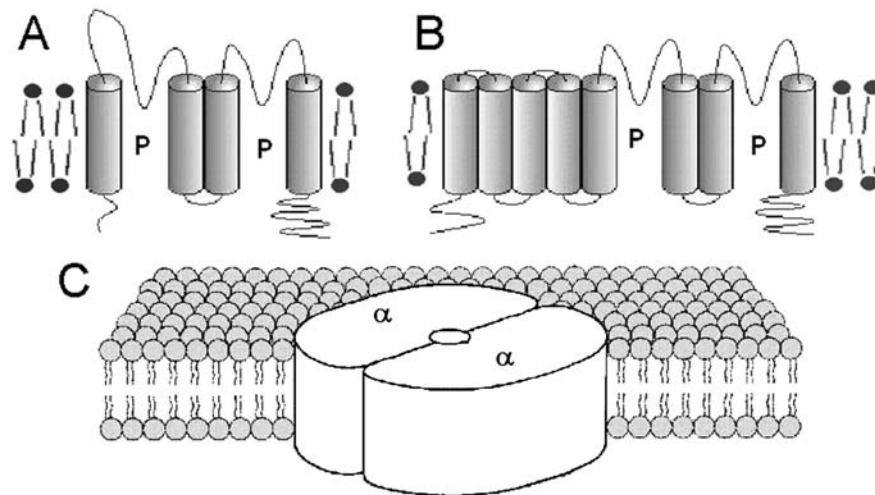
### 3.2.1. Canales de potasio con cuatro y ocho segmentos transmembranales.

Las familias que presentan cuatro y ocho segmentos transmembranales se han identificado recientemente y presentan dos regiones P en una subunidad  $\alpha$  (Esquema 2 y 3A y B). Se ha sugerido que estos canales se agregan en dímeros para formar un poro funcional (Esquema 3C) [Biggin *et al.* 2000]. Estos canales se conocen como canales de fuga. Los canales de cuatro segmentos transmembranales son más abundantes que los de ocho segmentos.

La organización del genoma humano (HUGO) ha asignado a los canales de cuatro segmentos transmembranales la nomenclatura de canales KCNK, también se les ha denominado canales TASK, TREK, TRAAK y TWIK. Estos canales se han localizado en levaduras y en el sistema nervioso central de la rata y el ratón [Reyes *et al.* 2000]. Estos canales también abundan en el genoma de *C. elegans* en donde se han identificado al menos 50 genes de este tipo [Wang *et al.* 1999]. Los estudios de

expresión funcional muestran que estos canales presentan una ligera rectificación pero no se ha observado dependencia al voltaje [Hille 2001]. Algunos KCNK son sensibles a estímulos mecánicos y otros a segundos mensajeros; se ha observado que son el blanco de anestésicos volátiles como la bupivacaina que bloquea directamente a estos canales [Biggin *et al.* 2000].

Los canales con ocho segmentos transmembranales se han identificado únicamente en las levaduras (Esquema 3). Estos canales conducen una corriente saliente de potasio cuya apertura es favorecida por la despolarización y por el decremento en la concentración de  $K^+$  externo [Hille 2001]. En estos canales se ha observado un bloqueo de la corriente por iones  $Mg^{2+}$  dependiente del voltaje [Hille 2001, Lesage *et al.* 1996, Biggin *et al.* 2000].

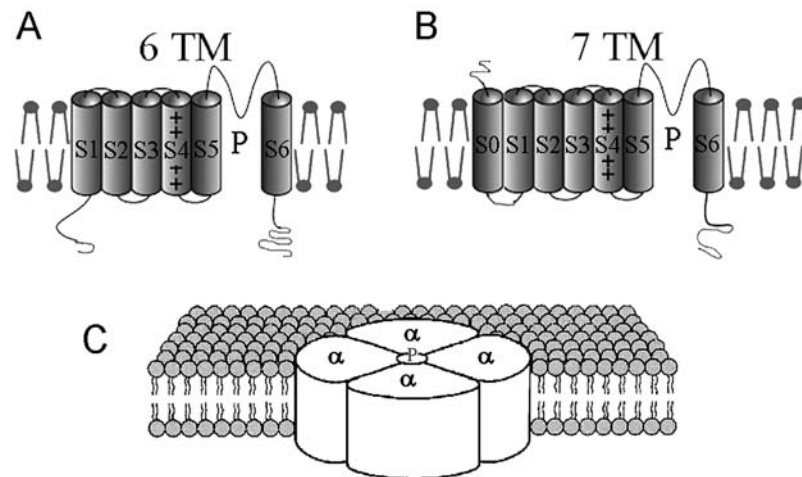


**Esquema 3.** Topología de las subunidades alfa de los canales de potasio con dos regiones P. A) Canales con dos regiones del poro (P) y cuatro segmentos transmembranales. B) Dos dominios del poro y ocho segmentos transmembranales. Se ha sugerido que estos canales se agregan en dímeros para formar un canal funcional (C) [A y B modificado de Biggin *et al.* 2000].

### 3.2.2. Canales de potasio con seis y siete segmentos transmembranales.

Los canales cuya subunidad  $\alpha$  presenta seis segmentos transmembranales y una región P incluyen a la familia de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), los KCN, los HCN, los eag, los TRP y los canales de potasio activados por calcio de baja y mediana conductancia ( $K_{Ca^{2+}}$ ) [Aidley y Stanfield 1998, Jan y Jan 1997, Hille 2001]. Tanto el grupo amino como el carboxilo son citoplásmicos (Esquema 4A).

Únicamente los canales de potasio activados por  $Ca^{2+}$  de alta conductancia (BK) presentan una subunidad  $\alpha$  con siete segmentos transmembranales [Hille 2001]. En este tipo de canales el grupo amino queda del lado extracelular (Esquema 4B).



**Esquema 4.** Topología de los canales de potasio con seis y siete segmentos transmembranales. En B se observa que estos canales tienen un segmento (S) extra el S0 y la región amino terminal se encuentra del lado extracelular. El segmento S4 con cargas positivas (A y B). C) Estos canales se agregan en tetrámeros para formar un poro funcional. [A Modificado de Bigging 2000].

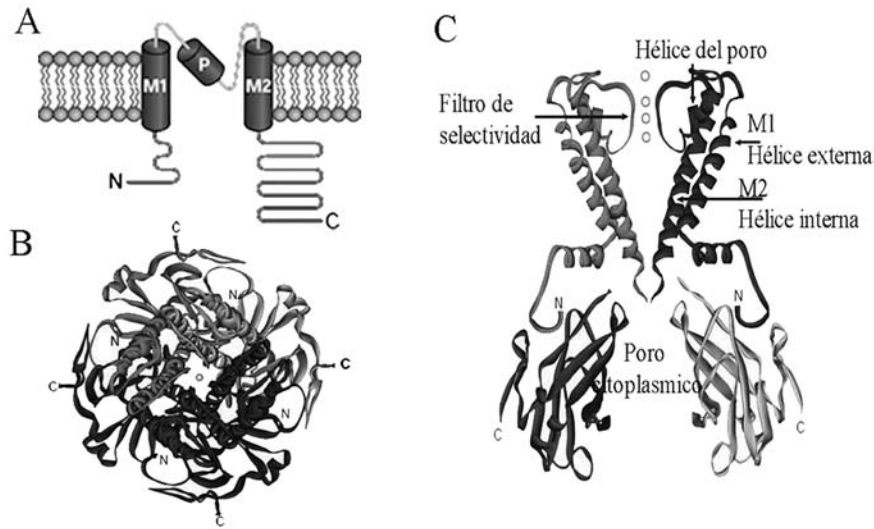


Este tipo de canales se agregan en homotetrámeros o heterotetrámeros para formar un canal funcional (Esquema 4C) [Ruppersberg *et al.* 1990, Shen *et al.* 1993]. Entre los segmentos S5 y S6 se localiza la región del poro. En el cuarto segmento transmembranal (S4) generalmente se encuentra una lisina (K) o una arginina (R) en cada tres aminoácidos [Jan y Jan 1997]. Estos aminoácidos cargados positivamente responden a cambios en el voltaje aumentando la probabilidad de apertura cuando el potencial de membrana se despolariza [Aggarwal y Makinnon 1996, Seoh *et al.* 1996, Bezanilla 2000]. Por lo anterior, al segmento S4 se le conoce como el sensor de voltaje. La función principal de los canales Kv es la repolarización de la membrana durante el potencial de acción.

### **3.2.3. Canales de potasio con dos segmentos transmembranales.**

Los canales cuya subunidad  $\alpha$  se encuentra formada por dos segmentos transmembranales (M1 y M2) pertenecen a la familia de los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir; Esquema 5). Entre los segmentos M1 y M2 se encuentra la región que forma el poro (Esquema 5) [Ho *et al.* 1993, Kubo *et al.* 1993]. Al igual que los canales Kv, estos canales se agregan en tetrámeros para formar un canal funcional (Esquema 5B y C) [Kubo *et al.* 1993].

Por su topología, los canales Kir parecen ser menos complejos que los canales de potasio sensibles a voltaje; sin embargo, las cinéticas de apertura, de activación, de inactivación, así como la de modulación, entre otras, son muy complejas [Nichols y Lopatin 1997]. Las características de esta familia se describen en el capítulo siguiente.

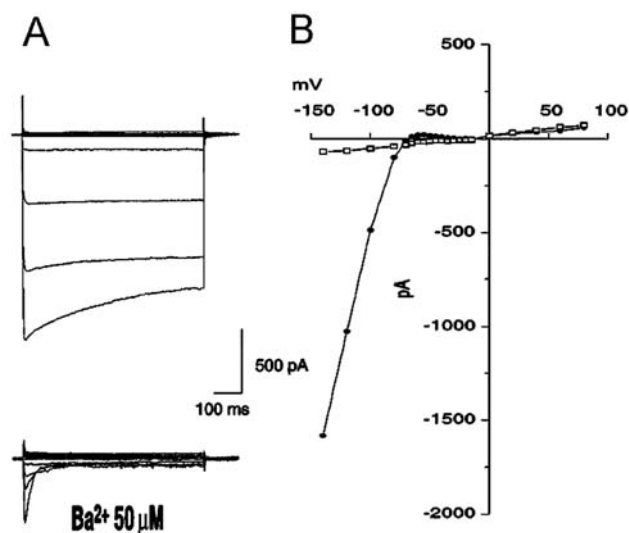


**Esquema 5.** Topología de los canales Kir. A) Representación esquemática de una subunidad  $\alpha$ . Cada subunidad comprende dos segmentos transmembranales (M1 y M2), una región del poro (P) y tanto el amino (N) como el carboxilo (C) terminal son citoplasmáticos. B) Vista extracelular del tetramero de un canal bacterial KirBac1.1 donde se observa el poro. C) Muestra el arreglo de los dominios transmembranales de dos subunidades  $\alpha$  del canal KirBac1.1. La región del carboxilo terminal corresponde a las subunidades vecinas. Las esferas representan los iones  $K^+$  en el filtro de selectividad. [Modificado de Bichet *et al.* 2003].

#### 4. Los canales de potasio rectificadores entrantes (Kir).

Los canales tipo Kir fueron descritos por primera vez por Bernard Katz (1949) en el músculo esquelético de la rana. Debido a que el tipo de rectificación que se conocía hasta entonces era la de los canales de potasio rectificadores tardíos, se les denominó rectificadores anómalos [Hille 2001]. Esta corriente anómala o de rectificación entrante predomina a voltajes por debajo del potencial de reposo y declina con la despolarización de la membrana (Esquema 6A y B). La corriente anómala es altamente sensible al bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo (Esquema 6A) y se

estudió en preparaciones diversas como son los ovocitos de estrellas de mar [Hagiwara y Takahashi 1974, Hagiwara *et al.* 1976], los ovocitos de tunicados [Ohmori 1978], las células del músculo esquelético [Standen y Stanfield 1978, Leech y Stanfield 1981] y del músculo cardiaco [Sakman y Trube 1984, Matsuda y Sperelakis 1993], las células  $\beta$  del páncreas [Inagaki *et al.* 1995 y 1997] y los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Bauer *et al.* 1996, Hedin *et al.* 1996, Salvador *et al.* 2001].



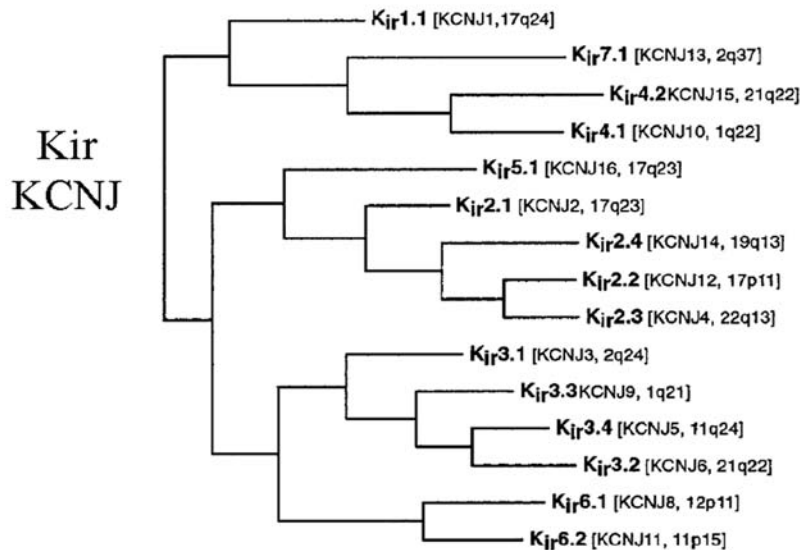
**Esquema 6.** *La corriente de los canales Kir.* A) Curso temporal de la corriente macroscópica de un canal de potasio Kir 2.1 en células BRL-1. Con un protocolo de pulsos de -140 a +80 mV, con incrementos de 20 mV, y un potencial de mantenimiento de -60 mV. El panel inferior muestra el bloqueo de la corriente al adicionar  $\text{Ba}^{2+}$ . B) Relación corriente- voltaje (I/V) de las corrientes registradas en A, los círculos oscuros muestran la corriente control y los cuadros claros muestran la corriente registrada en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$ . [Tomada de Bianchi *et al.* 1996].

El papel fisiológico de los canales Kir es el de mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ión potasio ( $E_K$ ). En consecuencia, regulan la excitabilidad celular, la secreción de insulina y mantienen el balance electrolítico [Lu 2004]. Algunos de estos canales pueden ser modulados en forma indirecta por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos celulares [Hille 2001]. También son regulados por elementos intracelulares y membranales como son los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, el ATP, las cinasas, el pH y las proteínas heterotriméricas G, entre otros [Ruppersberg 2000].

#### **4.1. Clasificación de los canales Kir.**

En 1993 el grupo de Ho y de Kubo reportaron la clonación de los primeros canales Kir. Doupnik y colaboradores (1995) agruparon a los canales Kir en varias subfamilias tomando como base su secuencia de aminoácidos y sus propiedades. Los canales que muestran más del 65% de identidad se agrupan dentro de una misma subfamilia, como por ejemplo el canal GIRK4 y el GIRK5 que presentan el 78% de identidad pertenecen a la subfamilia Kir 3. La organización del genoma humano (HUGO) ha asignado la nomenclatura de KCNJ para los canales Kir [Gutman *et al.* 2003]. Esta nomenclatura no se basa en las características estructurales de los canales ni en la relación filogenética que existe entre estas proteínas por lo que en este trabajo utilizaremos la nomenclatura propuesta por el grupo de Doupnik para clasificar a los canales Kir.

Hasta la fecha se han identificado siete subfamilias (Kir 1 - Kir 7). La construcción del árbol filogenético muestra que algunas de estas familias se encuentran más relacionadas que otras (Esquema 7) [Gutman *et al.* 2003]. Las características de cada subfamilia se describen a continuación.



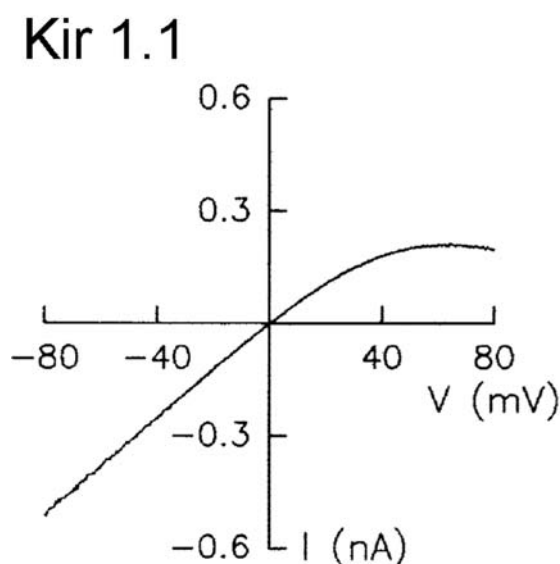
**Esquema 7.** *Arbol filogenético de los canales Kir.* El alineamiento de la secuencia se realizó utilizando el método de clustal W. Entre corchetes se muestra la nomenclatura de los canales según HUGO [Modificada de Gutman *et al.* 2003].

#### 4.1.1. La subfamilia Kir 1.x (ROMK).

El primer canal clonado fue el Kir 1.1 (KCNJ1) a partir de riñón de rata [Ho *et al.* 1993]. Se expresa abundantemente en el riñón y también se ha identificado en el cerebro [Ho *et al.* 1993, Kenna *et al.* 1994, Boim *et al.* 1995, Nichols y Lopatin 1997]. Trabajos posteriores han reportado la existencia de isoformas con propiedades funcionales muy similares a las del Kir 1.1, las cuales se generan mediante el empalme alternativo del ácido ribonucleico (ARN) [Shuck *et al.* 1994, Zhou *et al.* 1994].

A diferencia de otras subfamilias, Kir 1.1 presenta un sitio de unión a fosfatos en la región del carboxilo terminal [Ho *et al.* 1993]. La activación mediada por ATP implica la fosforilación de la proteína y es dependiente de la adenosina 3', 5' monofosfato cíclico (AMPC) [Xu *et al.* 1996]. Debido a que la rectificación no es

muy fuerte en estos canales se les denomina rectificadores débiles (Esquema 8). La conductancia unitaria registrada para el canal Kir 1.1 (ROMK1) es de 30 pS [Lu y Mackinnon 1994a]. Estos canales median la excreción de  $K^+$  en las células del túbulo colector cortical, y el reciclamiento de  $K^+$  en la porción gruesa ascendente del asa de Henle [Palmer *et al.* 1997].



**Esquema 8.** *El canal Kir 1.1.* Curva corriente (I) contra voltaje (V) del canal Kir 1.1 (KCNJ1) registrado en parches de ovocitos de la rana *Xenopus* en la configuración de célula unida (cell attach). Se observa la rectificación débil característica de los canales Kir 1. Los registros se realizaron utilizando una solución de registro con 100 mM de  $K^+$  [Modificado de Lu 2004].

Diversas mutaciones en el gen que codifica para el canal Kir 1.1 (ROMK1) producen el síndrome de Bartter [Simon *et al.* 1996, Derst *et al.* 1997, Flagg *et al.* 1999], una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por hipopotasemia, alcalosis, hipercalciuria, hiperaldosteronismo y presión arterial baja [Simon *et al.* 1996, Derst *et al.* 1997, Flagg *et al.* 1999]. En esta enfermedad se produce una

disminución del  $K^+$  en la luz del túbulo distal del riñón, lo que impide la reabsorción de  $Cl^-$  y  $Na^+$  a través del intercambiador de  $Na^+/K^+/2Cl^-$  lo cual provoca una pérdida de sales en ese segmento de la nefrona.

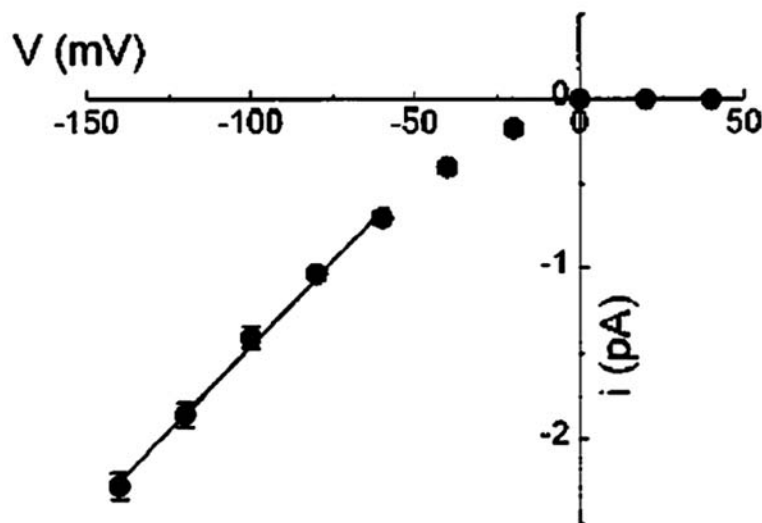
#### **4.1.2. La subfamilia Kir 2x (IRK).**

Estos canales se localizan principalmente en el corazón, el cerebro y el músculo esquelético [Kubo *et al.* 1993, Perier *et al.* 1994, Raab-Graham *et al.* 1994, Wible *et al.* 1995]. Hasta la fecha se han clonado cuatro miembros de esta subfamilia (Esquema 7). La diferencia entre ellos radica en su sensibilidad a la fosforilación [Fakler *et al.* 1994, Henry *et al.* 1996]. Las corrientes del canal Kir 2.3 se inhiben al activar a la PKC mientras que en las corrientes del canal Kir 2.1 no se observa ningún efecto [Henry *et al.* 1996]. La conductancia unitaria del canal de humano Kir 2.1 (32 pS) es mayor a la observada en el canal Kir 2.2 (10 pS) y a la de ratón Kir 2.1 (23 pS) [Tang *et al.* 1995]. Estos canales se conocen como rectificadores fuertes y, al igual que los canales Kir 1.1, se han estudiado para determinar los sitios que participan en la rectificación (Esquema 9) [Lu 2004].

La función del canal Kir 2.1 (KCNJ2) ha sido ampliamente estudiada en el corazón, en donde regula el flujo de  $K^+$  durante la fase terminal de la repolarización [Sanguinetti y Tristani-Firouzi 2000].

Mutaciones en el gen del canal Kir 2.1 provocan el síndrome de Andersen [Plaster *et al.* 2001], una enfermedad rara que puede ser de dos tipos. En un caso el músculo esquelético sufre parálisis periódicas provocadas por la relajación anormal del músculo y la formación de agregados tubulares en las células. En el segundo tipo, el fenotipo cardiaco, se observa un aumento en el intervalo QT y taquicardia. Por otra parte, se ha observado que los individuos que presentan dicha enfermedad pueden presentar cambios morfológicos externos como son: baja estatura, escoliosis (curvatura lateral anormal de la columna vertebral),

hipertelorismo orbitario (aumento de la distancia interorbitaria) y mentón retraído entre otras [Schulze-Bahr 2005].



**Esquema 9.** Curva  $I$ - $V$  del canal Kir 2.1. Los registros utilizados para la realización de la curva se obtuvieron parches de ovocitos de la rana *Xenopus*, en la configuración de célula unida, con una solución de 100 mM de  $K^+$  [Tomado de Shieh *et al.* 1999].

#### 4.1.3. La Subfamilia Kir 3 (GIRK).

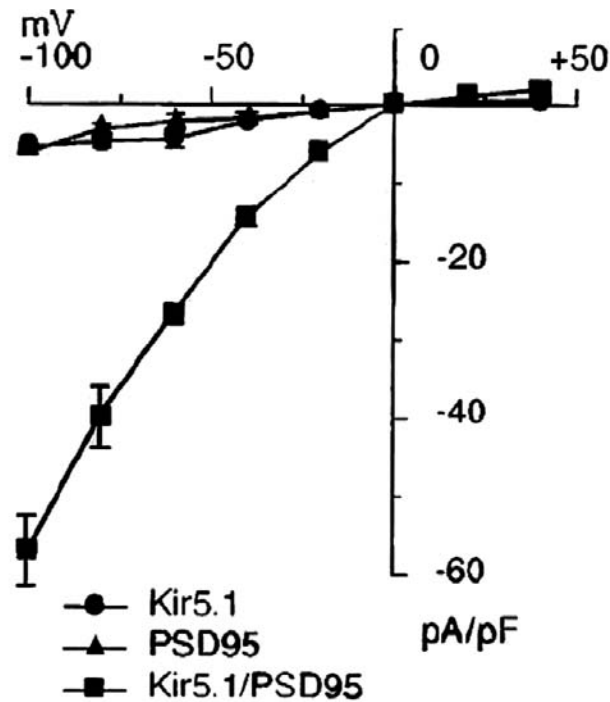
Estos canales son activados por proteínas G por esa razón reciben el nombre de canales GIRK. Las características de esta subfamilia se describirán en un capítulo aparte.

#### 4.1.4. La subfamilia Kir 4 y Kir 5.

Las familias Kir 4 y Kir 5 se describieron por primera vez en el cerebro [Bond *et al.* 1994]. Se ha observado que Kir 4.1 y Kir 5.1 forman heterotetrámeros funcionales en el riñón [Tanemoto *et al.* 2000, Tucker *et al.* 2000, Casamassima *et al.*



2003]. Cuando Kir 4.1 (KCNJ10) o Kir 5.1 (KCNJ16) se expresan como homomultímeros en sistemas de expresión heterólogos únicamente Kir 4.1 forma canales funcionales [Bond *et al.* 1994, Tanemoto *et al.* 2002]. Kir 5.1 sólo puede formar homotetrámeros funcionales con la ayuda de una proteína de anclaje PDZ (Psd-95; Esquema 10) y es regulado por proteínas cinasas A (PKA) [Tanemoto *et al.* 2002]. La conductancia unitaria del homomultímero de Kir 4.1 es de 25.2 pS, mientras que la del heterotetrámero Kir4.1/Kir5.1 de 59 pS [Pessia *et al.* 2001, Yang *et al.*, 2000].



**Esquema 10.** Efecto de la proteína PSD95 en la expresión de los canales Kir 5.1. Relación I-V de los canales Kir 5.1 transfectados sólo o en combinación con la proteína de anclaje PSD95 en las células HEK 293. Las corrientes totales se registraron en una solución alta en potasio (140 mM) en la pipeta de registro. Un protocolo de pulsos de -100 a +40 mV, con pasos de 20 mV, y un potencial de mantenimiento de 0 mV [Tomado de Tanemoto *et al.* 2002].

Kir 4.1 y Kir 5.1 son sensibles al pH intracelular. Se ha observado que el homotetrámero Kir 4.1 se inhibe solamente por la acidificación intracelular (pH=6.0) mientras que el heterotetrámero Kir4.1/Kir5.1 lo hace en el rango del pH fisiológico (pH= 7.4) [Xu *et al.* 2000, Pessia *et al.* 2001, Casamassima *et al.* 2003].

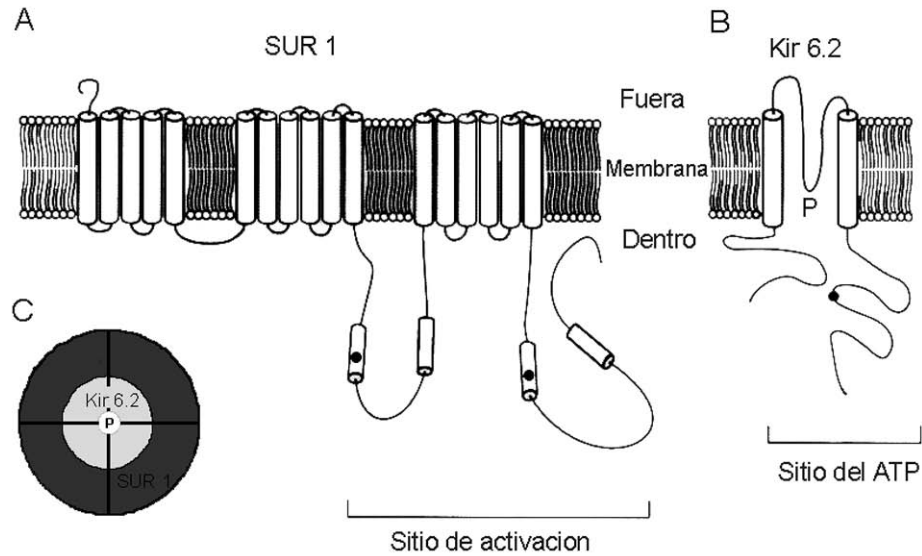
#### **4.1.5. La subfamilia Kir 6 ( $K_{ATP}$ ).**

La expresión funcional de estos canales está estrechamente relacionada con la expresión de una subunidad  $\alpha$ , el receptor de sulfonilureas (SUR; Esquema 11) [Aguilar-Bryan *et al.* 1995]. El receptor SUR presenta 17 segmentos transmembranales (Esquema 11A) [Tusnady *et al.* 1997]. Existe una asociación física entre los canales Kir 6 y el receptor SUR [Inagaki *et al.* 1995, Clement *et al.* 1997, Babenko *et al.* 1998, Tarasov *et al.* 2004]. De esta manera los canales Kir 6.1 (KCNJ8) o Kir 6.2 (KCNJ11) se ensamblan con el receptor SUR en una configuración octamérica (Esquema 11C) [Aguilar-Bryan *et al.* 1992]. La conductancia unitaria del canal Kir 6.1 es de 37.3 pS [Sim *et al.* 2002].

Las sulfonilureas, una clase de droga utilizada en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus no dependientes de insulina, actúan como un potente inhibidor de los canales Kir 6 a través del receptor SUR [Babenko *et al.* 1998]. Cuando los canales Kir 6 se encuentran abiertos el potencial de membrana de las células  $\beta$  del páncreas es de aproximadamente -80 mV. Al aumentar la glucosa intracelular, se incrementan los niveles de ATP, esto induce el cierre de los canales Kir6.x ( $K_{ATP}$ ) y con ello la despolarización de la célula. Esta despolarización activa a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Con el influjo persistente de  $Ca^{2+}$  aumenta la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y como consecuencia la liberación de la insulina [Babenko *et al.* 1998, Aguilar-Bryan y Bryan 1999].

Mutaciones en los genes de los canales Kir 6.x y/ o del receptor SUR provocan el síndrome de hipoglucemia hiperinsulinémica infantil, un desorden

caracterizado por una secreción continua de insulina e hipoglucemia en neonatos. [Babenko *et al.* 1998, Aguilar-Bryan y Bryan 1999].



**Esquema 11.** Topología del canal  $K_{ATP}$ . Estos canales se encuentran formados por la estrecha unión una subunidad  $\beta$  (A), el receptor a sulfonilureas (SUR1) y el canal Kir 6.x (B). Al formar una canal funcional estos se agregan en una conformación octamérica (C). [Modificado de Tarasov *et al.* 2004].

#### 4.1.6. La subfamilia Kir 7.

El primer canal de esta subfamilia fue clonado en 1998 a partir de una biblioteca de ácido dextrorribonucleico complementario (ADNc) de cerebro humano (Kir 7.1; KCNJ13) [Krapivinsky *et al.* 1998a, Partiseti *et al.* 1998]. Los canales se encuentran abundantemente en las células piramidales, en las células de purkinje, en el cerebelo y en el hipocampo [Krapivinsky *et al.* 1998a]. También se encuentran presentes en el riñón, en el estómago y en el intestino delgado [Krapivinsky *et al.* 1998a, Partiseti *et al.* 1998].

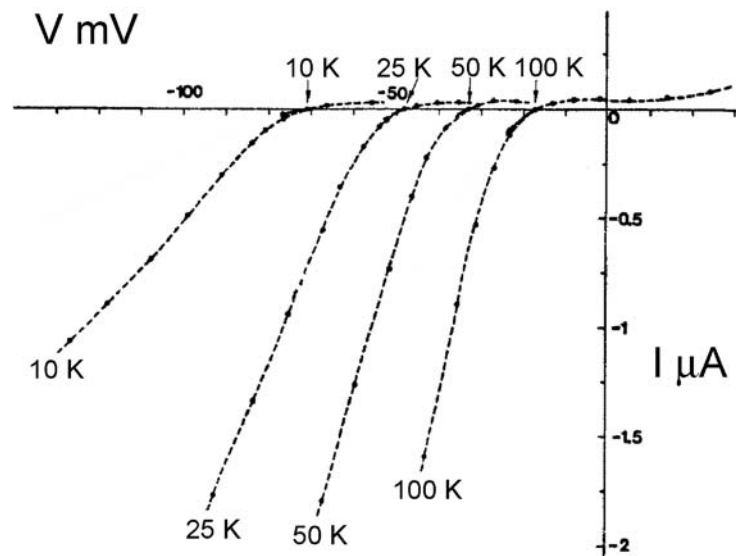
Esta subfamilia presenta el mayor grado de homología con la subfamilia Kir 1 y Kir 4 (Esquema 7). Los canales Kir 7 al igual que los canales Kir 1 presentan una ligera rectificación [Krapivinsky *et al.* 1998a, Partiseti *et al.* 1998]. La conductancia unitaria estimada de los canales Kir 7 es muy baja, 50 fS [Krapivinsky *et al.* 1998a].

La subfamilia Kir 7.x es la primera que presenta un residuo de metionina en la posición 125 (M125) localizada en la región del poro [Krapivinsky *et al.* 1998a, Partiseti *et al.* 1998]. En esta posición los otros canales Kir conocidos hasta hoy presentan una arginina (R). El reemplazo de la metionina por la arginina (M125R) incrementa significativamente la conductancia unitaria y la sensibilidad al Ba<sup>2+</sup> externo [Krapivinsky *et al.* 1998a]. Esto indica que este sitio es de gran importancia en la determinación de la conductancia unitaria de los canales Kir [Krapivinsky *et al.* 1998a]. Los canales Kir son bloqueados de manera extracelular por sodio (Na<sup>+</sup>), cesio (Cs<sup>+</sup>) y bario (Ba<sup>2+</sup>) [Kubo *et al.* 1993, Salvador *et al.* 2001]. Un hecho notable de estos canales es su baja sensibilidad al bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo (EC<sub>50</sub>= 1 mM Tabla 2). En la tabla 2 se observa la sensibilidad al bloqueo por el Ba<sup>2+</sup> externo de los canales Kir.

<b>Tabla 2.</b> Sensibilidad de los canales Kir al Ba <sup>2+</sup> externo.			
Subfamilia	Canal	EC <sub>50</sub> [Ba <sup>2+</sup> μM]	cita
Kir 1 o ROMK	Kir 1.2	70 (-100 mV)	Zhou <i>et al.</i> 1994
Kir 2 o IRK	Kir 2.2	50 (-100 mV)	Takahashi <i>et al.</i> 1994.
Kir 3 o GIRK	Kir 3.1/3.4	500 (-80 mV)	Krapivinsky <i>et al.</i> 1995
	Kir 3.5	102 (-100 mV)	Salvador <i>et al.</i> 2001
Kir 4	Kir 4.1	30 (-100 mV)	Bond <i>et al.</i> , 1994
Kir 6	Kir 6.2	500 (-100 mV)	Sakura <i>et al.</i> 1995
Kir 7	Kir 7.1	1000 (-100mV)	Krapivinsky <i>et al.</i> 1998a

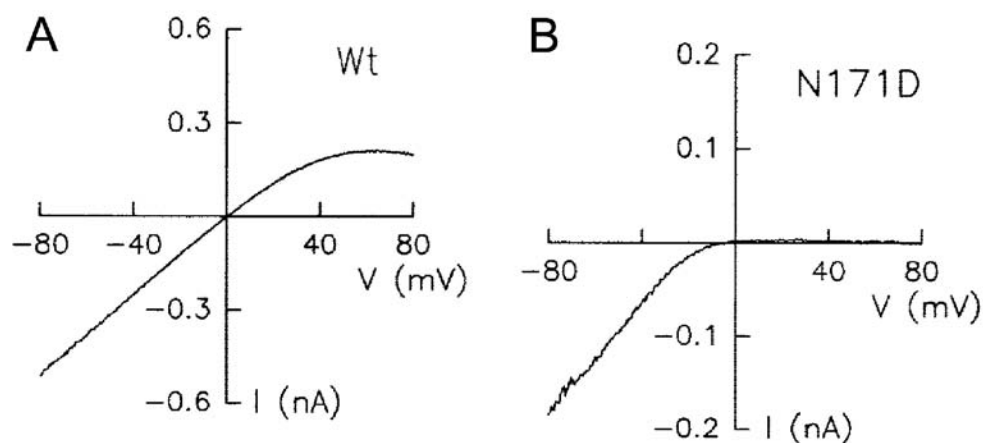
#### 4.2. Rectificación entrante.

La corriente entrante inducida a voltajes hiperpolarizantes respecto al  $E_K$  es de mayor magnitud comparada con la corriente saliente producida a voltajes despolarizantes, aun cuando las concentraciones de  $K^+$  sean iguales en ambos lados de la membrana [Nichols y Lopatin 1997, Lu 2004]. Esta propiedad de rectificación se debe principalmente al bloqueo interno, dependiente del voltaje, de la corriente saliente por el ión  $Mg^{2+}$  (Esquema 12) [Matsuda *et al.* 1987, Vandenberg 1987, Horie *et al.* 1987] y por las poliaminas citosólicas como la espermina y espermidina [Lopatin *et al.* 1994, Bianchi *et al.* 1996, Oliver *et al.* 2000, Lu 2004]. Parte de esta rectificación parece ser intrínseca y ocurre en menos de 1 ms [Hille 2001]. Al aumentar la concentración de  $K^+$  externo, el voltaje de reversión de la corriente se desplaza a voltajes positivos en relación con el potencial de equilibrio para el  $K^+$  (Esquema 12) [Hagiwara y Yoshii 1979, Lu 2004].



**Esquema 12.** Efecto de la concentración de  $K^+$  externo en los canales  $K_{ir}$ . Relación I-V en ovocitos de estrellas de mar utilizando diferentes concentraciones de  $K^+$  externo (10, 25, 50 y 100 mM) en un medio libre de  $Na^+$ . [Modificado de Lu 2004].

Dependiendo de la subfamilia que se trate, la corriente saliente es mínima o nula (Esquema 9 y 12). La presencia de un residuo de aspartato (D172 en Kir 2.1), altamente conservado en el dominio M2, es crucial para la rectificación [Lu 2004]. Los rectificadores débiles como los Kir 1.1 poseen una asparagina (N171), en lugar del aspartato presente en el canal Kir 2.1 (D172). Si se muta este residuo de asparagina por el de aspartato (N171D) en el canal Kir 1.1, se observa que la sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  y por las poliaminas aumenta significativamente, y, por lo tanto, el grado de rectificación (Esquema 13) [Stanfield *et al.* 1994, Lu y Mackinnon 1994b].



**Esquema 13.** *Un aspartato en M2 es responsable de la rectificación entrante.* A) Relación I-V de un canal rectificador débil (Kir 1.1) que posee una asparagina (N171) en lugar de un aspartato (D) como en los canales Kir 2.1. B) Relación I/V del canal mutante Kir 1.1 N171D donde se muestra una fuerte rectificación. El aspartato se encuentra localizado en la región M2 [Tomado de Lu 2004].

Por otra parte, se identificó que dos residuos de glutamato (E224 y E299 en Kir 2.1) ubicados en el C-terminal también intervienen en el proceso de rectificación de los canales Kir [Yang *et al.* 1995, Lu 2004]. Los aminoácidos identificados en el

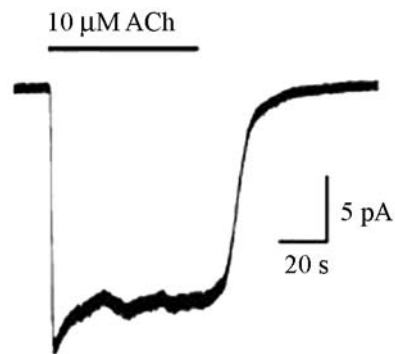
dominio M2 (D172 en Kir 2.1) y en el C-terminal (E224 y E229 en Kir 2.1) actúan, aparentemente, de una forma cooperativa [Lu 2004]. Además, estos experimentos sugieren que parte del C-terminal está implicado en la formación del poro. El “gating” de los canales depende principalmente de la concentración de  $K^+$  externo y del potencial de membrana ( $E_m$ ) [Hagiwara y Yoshii 1979, Matsuda 1991, Kubo 1996].

#### **4.3. Características de los canales Kir 3 (GIRK).**

En los trabajos pioneros se observó que la estimulación del nervio vago induce la liberación de la acetilcolina (ACh) en las terminales nerviosas, provocando la disminución de la frecuencia cardíaca [Loewi, 1921]. La liberación de la ACh estimula la aparición de la corriente rectificadora entrante  $IK_{ACh}$  registrada en las células marcapaso del nodo sinoauricular (Esquema 14). Se ha observado que la ACh a través de la activación de los receptores muscarínicos  $m_2$  ( $AChm_2$ ), provoca la activación específica de los canales de potasio rectificadores entrantes de la subfamilia Kir3.x (GIRK) originando la corriente típica  $IK_{ACh}$  [Dascal 1997].

Desde la identificación molecular de los canales GIRK se ha observado que estos canales se expresan además del corazón, en el sistema nervioso (central y periférico), y en los tejidos endocrinos [Sadja *et al.* 2003]. El papel fisiológico de los canales GIRK es controlar la excitabilidad celular.

Cinco miembros de la subfamilia GIRK (Kir 3.x) han sido clonados hasta la fecha. Los canales GIRK1 (KCNJ3) [Kubo *et al.* 1993] y GIRK4 (KCNJ5) [Krapivinsky *et al.* 1995] fueron clonados de la aurícula y GIRK2 (KCNJ6) y GIRK3 (KCNJ9) del cerebro de mamíferos [Lesage *et al.* 1994]. En contraste, la isoforma GIRK5 se clonó de los ovocitos de un anfibio, la rana *Xenopus laevis* [Hedin *et al.* 1996]. Los canales de mamífero se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) [Karschin *et al.* 1997].



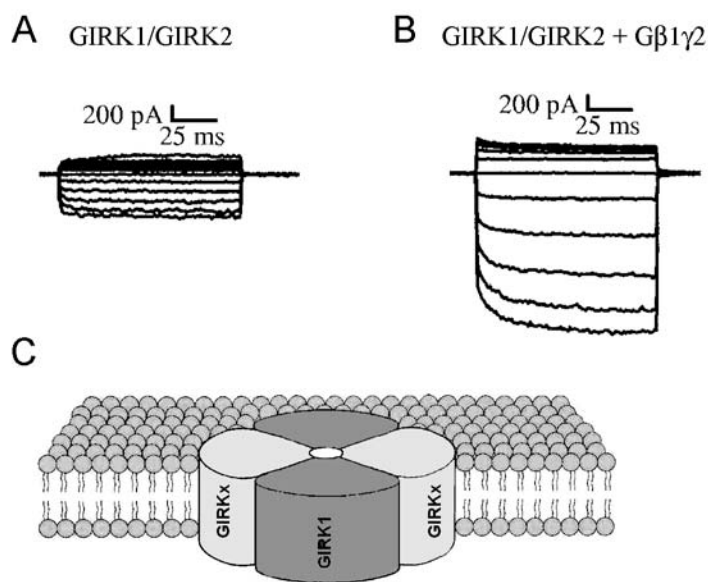
**Esquema 14.** *La corriente  $I_{K_{ACh}}$ .* Curso temporal de la corriente de potasio  $I_{K_{ACh}}$  en miocitos de la aurícula de ratón. [Tomada de Lomax *et al.* 2003].

La longitud de cada subunidad  $\alpha$  varía entre 393 (GIRK3) y 501 (GIRK1) aminoácidos. El grado de identidad observada para cada canal comparado entre varias especies de mamíferos es mayor al 90%, mientras que el grado de identidad observada entre las diferentes subunidades varía del 60 al 80% [Dascal 1997]. El amino terminal y el carboxilo terminal son las regiones en donde se presenta la mayor diferencia entre los miembros de la subfamilia GIRK (Kir 3).

En 1995 el grupo de Clapham demostró que la corriente típica  $I_{K_{ACh}}$  es producida por el heterotetrámero formado por la combinación del canal GIRK1 y el canal GIRK4 [Krapivinsky *et al.* 1995, Silverman *et al.* 1996]. Al transfectar a las células del ovario de hamster chino (CHO) con el ADNc de los canales GIRK1 y GIRK4 se registra la corriente  $I_{K_{ACh}}$ . Mientras que, al transfectar a las células CHO con el ADNc del canal GIRK1 no se registra función [Krapivinsky *et al.* 1995]. Por otra parte, se ha identificado que el canal GIRK1 usualmente colocaliza con los canales GIRK2, GIRK3 o GIRK4 en el cerebro de ratón [Karschin *et al.* 1997, Ponce *et al.* 1996]. Esto indica que los canales GIRK se agregan como heterotetrámeros del



canal GIRK1 con cualquier otra subunidad (GIRK2, 3 o 4). Estos heterotetrámeros forman canales funcionales con propiedades idénticas a la corriente cardíaca  $IK_{ACh}$  (Esquema 15) [Kennedy *et al.* 1999, Jelacic *et al.* 1999 y 2000].



**Esquema 15.** Activación de los canales GIRK por el dímero  $G\beta\gamma$ . Registro de las corrientes en células HEK293 transfectadas con los canales GIRK1/GIRK2 (A) y con la subunidad  $G\beta_1\gamma_2$  (B). C) Tetrámero compuesto de la subunidad GIRK1 con cualquier otro miembro (GIRKx) de los canales GIRK (GIRK2-GIRK4) [A y B modificadas de Zhao *et al.* 2003].

Estudios sobre el heterotetrámero GIRK1/GIRK4 indican que la subunidad GIRK4, y tentativamente GIRK2 o GIRK3, determinan el tráfico de los tetrámeros GIRK1/GIRKx a la membrana (Esquema 15C) [Kennedy *et al.* 1999]. Sin embargo, se han identificado homotetrameros formados por algunas de las variantes por empalme alternativo de los canales GIRK2 en testículo de ratón (GIRK2d) [Inanobe *et al.* 1999]; y, en la aurícula bovina, el homotetrámero del canal GIRK4 [Corey y Clapham 1998]. Mientras que el homotetrámero de GIRK2d es funcional, el del

canal GIRK4 no [Krapivinsky *et al.* 1998b, Corey y Clapham 1998, Inanobe *et al.* 1999, Jelacic *et al.* 1999]. Mutaciones puntuales en la región del poro de los canales GIRK1 (F137S) y GIRK4 (S143T) favorecen la actividad de estos canales como homotetrámeros [Chan *et al.* 1996, Vivaudou *et al.* 1997]. La utilización de los canales mutantes del poro ha permitido el avance en los estudios sobre la estructura, la función y la modulación de los canales GIRK [Chan *et al.* 1996, Vivaudou *et al.* 1997, He *et al.* 1999, Zeidner *et al.* 2001, Sadjja *et al.* 2001].

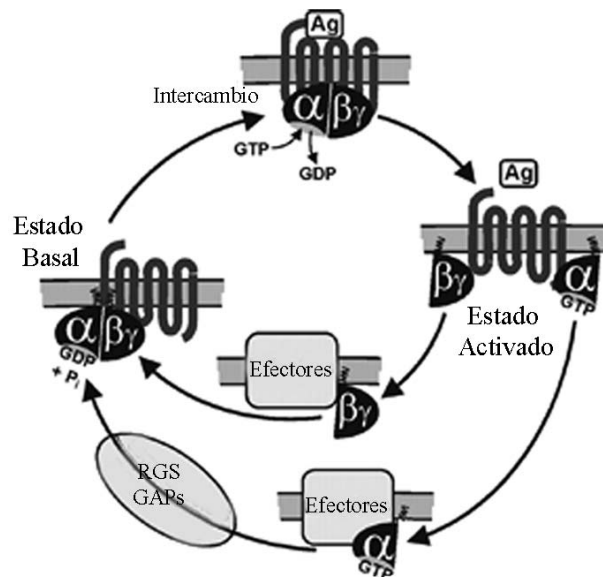
La conductancia unitaria del canal GIRK1/GIRK4 ( $IK_{ACh}$ ) es de aproximadamente 40 pS [Yamada *et al.* 1998].

#### **4.3.1. Activación de los canales GIRK por proteínas G.**

Los procesos celulares de señalización transmembranal permiten recibir información de los estímulos extracelulares como las hormonas y neurotransmisores entre otros. Estos sistemas están compuestos de dos elementos básicos, el receptor, el cual es capaz de reconocer un estímulo extracelular, y el efector, el cual es controlado por el receptor y puede desencadenar una cascada de señales de respuesta intracelular [Wettschureck y Offermanns 2005]. El sistema de señalización por proteínas G desencadena estos tipos de respuesta intracelular.

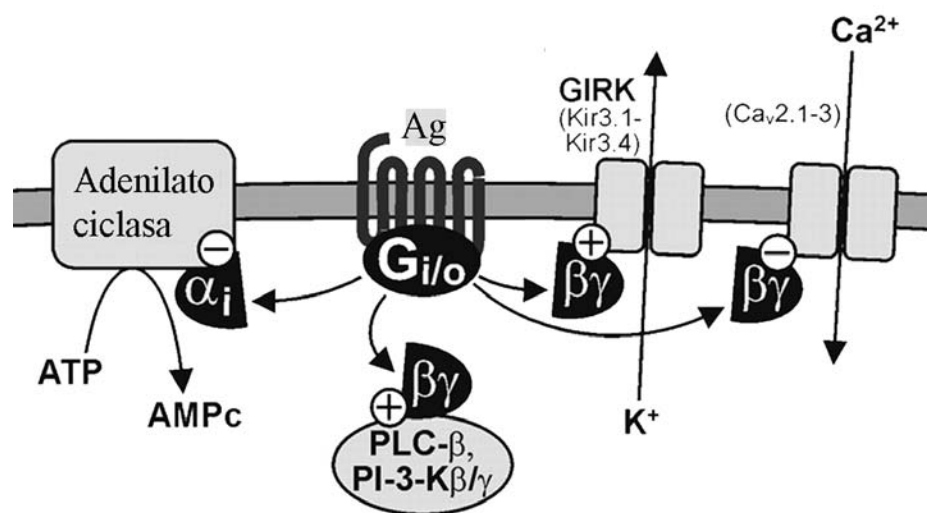
Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, la alfa ( $\alpha$ ) que une e hidroliza al GTP, la beta ( $\beta$ ) y la gama ( $\gamma$ ). Las dos últimas forman un dímero estable ( $G\beta\gamma$ ) que únicamente se disocia cuando se desnaturaliza la proteína (Esquema16) [Neer 1995]. En el estado basal, la subunidad  $G\alpha$  tiene sitios de unión para el GDP y el complejo  $G\beta\gamma$ . Cuando el receptor membranal acoplado a las proteínas G es activado, la afinidad por el GDP en la subunidad  $G\alpha$  disminuye y aumenta por el GTP, esto promueve el intercambio de GDP por GTP (Esquema 16). Esta unión provoca la disociación de la subunidad  $G\alpha_{GTP}$  del receptor y del complejo  $G\beta\gamma$  (Esquema 16). Las subunidades  $G\alpha_{GTP}$  y  $G\beta\gamma$  libres modulan la

actividad de una amplia variedad de efectores como las enzimas o canales iónicos [Neer 1995, Wettschureck y Offermanns 2005].



**Esquema 16.** *Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G.* Comienza cuando el agonista (Ag) se une al receptor y promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad Gα y la liberación del dímero Gβγ de la proteína G heterotrimérica. Las proteínas GAPs o RGS inducen la hidrólisis del GTP. El trímero se asocia nuevamente al receptor y se reinicia el ciclo. [Modificado de Wettschureck y Offermanns 2005].

La señalización termina cuando el GTP se hidroliza gracias a la actividad GTPasa de la subunidad Gα. El trímero se asocia nuevamente y se regresa al estado basal (Esquema 16). Las proteínas reguladoras de la señalización mediada por las proteínas G (RGSs o GAPs) incrementan la actividad GTPasa de la subunidad Gα, acelerando la hidrólisis de GTP y la asociación del trímero Gαβγ (Esquema 16) [Neer 1995, Wettschureck y Offermanns 2005].



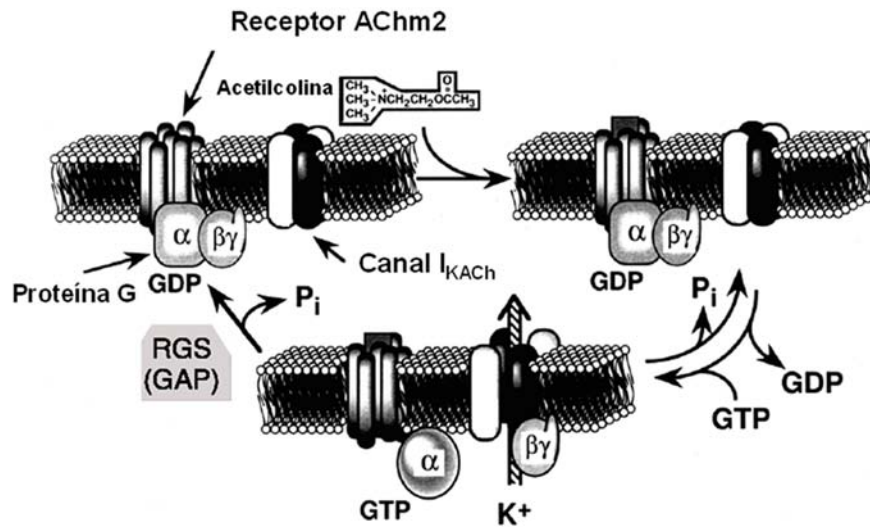
**Esquema 17.** Vía de señalización de las proteínas  $G_i/G\alpha_0$ . Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) el trómero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  ( $G_i/o$ ) se disocia y la subunidad  $G\alpha_i$  ( $\alpha_i$ ) inhibe a la cascada de señalización de la adenilato ciclasa. Por su parte, el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  ( $\beta\gamma$ ) regula a los canales iónicos [Modificada de Wettschureck y Offermanns 2005].

La subunidad  $G\alpha$  confiere las propiedades básicas de las proteínas  $G$  heterotríméricas y se subdividen en cuatro subfamilias  $G\alpha_s$  (activan a la adenilato ciclasa),  $G\alpha_i/G\alpha_0$  (inhiben a la adenilato ciclasa),  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  (Activan a la fosfolipasa C) y  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  (activan a la fosfolipasa A2) [Wettschureck y Offermanns 2005]. Únicamente las proteínas  $G\beta\gamma$  de la subfamilia  $G\alpha_i/G\alpha_0$  son capaces de activar a los canales Kir 3.1. Cuando el receptor se activa, las proteínas heterotríméricas  $G\alpha_i/G\alpha_0$  se activan y la subunidad  $G\alpha$  inhibe a la adenilato ciclasa. (Esquema 17) [Mark y Herlitz 2000, Wettschureck y Offermanns 2005]. Las proteínas  $G\alpha_i/G\alpha_0$  son sensibles a la toxina de *Bordetella pertussis*, la toxina pertussis, la cual evita que la proteína interactúe con el receptor [Wettschureck y Offermanns 2005].

Existen al menos cinco tipos de la subunidad  $G\beta$  y doce de la subunidad  $G\gamma$  identificadas en el genoma de humano y de ratón [Wettschureck y Offermanns 2005]. Inicialmente, el complejo  $G\beta\gamma$  no se asoció con alguna función en el proceso de señalización. Posteriormente se identificó que el dímero  $G\beta\gamma$  puede regular diversos efectores entre los que se encuentran la fosfolipasa A2 [Jelsema y Axelrod 1987], la fosfolipasa  $\beta$  [Wettschureck y Offermanns 2005], la adenilato ciclasa, la ATPasa de  $Ca^{2+}$ , los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P, Q y L, y, los canales Kir 3 [Logothetis y Zhang 1999, Wettschureck y Offermanns 2005].

Los canales Kir 3 dependen de la activación de las proteínas  $G\alpha_i/G\alpha_o$  heterotriméricas ( $G\alpha\beta\gamma$ ) acopladas a receptores membranales. Existen varios receptores que activan a los canales GIRK, estos son: el muscarínico m2 (AChm<sub>2</sub>), el adrenérgico  $\alpha_2$ , el Dopaminérgico D2, el de serotonina (5HT1A), el de adenosina A1, el de ácido  $\gamma$ -aminobutírico B (GABA-B), el de esfingosina 1-fosfato, el de somatostatina y los opioides  $\kappa$ ,  $\mu$  y  $\delta$  [Werner *et al.* 1996, Yamada *et al.* 1998, Smith *et al.* 2001, Hille 2001]. Todos ellos se acoplan a las proteínas  $G\alpha_i/G\alpha_o$  sensibles a la toxina pertussis. Al activarse los receptores se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  y, finalmente, la disociación de  $G\alpha_{GTP}$  y  $G\beta\gamma$  como dímero y, como consecuencia, la activación de los canales GIRK (Esquemas 17 y 18) [Neer 1995].

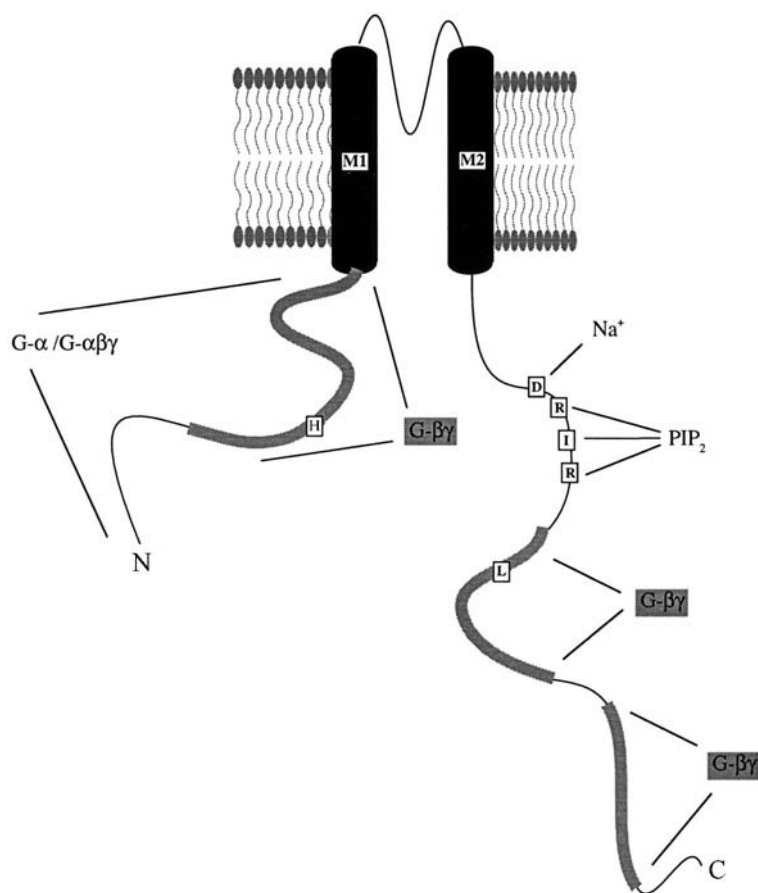
La desactivación de los canales GIRK se determina por la tasa de retención de las proteínas  $G\beta\gamma$  por las proteínas  $G\alpha$ . Las proteínas RGS o GAP aceleran la terminación de este tipo de señalización mediante el incremento de la actividad GTPasa; esto es, a través de la interacción directa con las proteína  $G\alpha$  (Esquema 18) [Yamada *et al.* 1998, De Vries *et al.* 2000]. Se ha observado que las proteínas RGS son capaces de acelerar la cinética de activación y desactivación dependiente de receptor de los canales GIRK en sistemas de expresión heterólogas (Esquema 18) [Doupnik *et al.* 1997, Saitoh *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2002]



**Esquema 18.** Ciclo de activación de los canales GIRK por las proteínas G. Activación y desactivación de los canales GIRK en respuesta a la acetilcolina (ACh) [Modificada de Yamada *et al.* 1998].

Diversos estudios han demostrado la unión directa de las proteínas Gβγ a los canales GIRKs [Krapivinsky *et al.* 1995, Kunkel y Peralta 1995, Inanobe *et al.* 1995, Huang *et al.* 1995 y 1997, Sadjja *et al.* 2002, Ivanina *et al.* 2003]. De las proteínas Gβγ clonadas hasta la fecha, la combinación de Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> es la que activa con mayor eficacia a los canales GIRK [Kofuji *et al.* 1995]. Las subunidades Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> pueden interactuar directamente con el amino (N) y el carboxilo (C) terminal de los canales GIRK [Huang *et al.* 1995 y 1997]. En los canales GIRK la corriente basal y la inducida por el agonista son dependientes de proteínas Gβγ [Rishal *et al.* 2005]. Diversas regiones en los dominios intracelulares de los canales GIRK están implicados en la unión de las proteínas Gβγ. El grupo de Huang (1997) encontró en el canal GIRK1 que los sitios de unión de las proteínas Gβγ comprenden los aminoácidos del 34 al

86, localizados en la región amino terminal, y en la carboxilo terminal del 318 al 374 y del 390 al 462 [Huang *et al.* 1997].



**Esquema 19.** *Moduladores de los canales GIRK.* Sitios de unión a las proteínas G, al Na<sup>+</sup> y al PIP<sub>2</sub>, identificadas en los canales GIRK. Histidina (H), arginina (R), aspartato (D), isoleucina (I), leucina (L), amino (N) y carboxilo (C) terminal [Modificada de Mark y Herlitze 2000].

A través de la formación de proteínas quimeras entre los canales GIRK4 y el Kir 2.1, y de mutaciones puntuales, se logró identificar que un residuo de leucina (L339 en GIRK4, L333 en GIRK1), localizado en la región del carboxilo terminal, es indispensable en la activación de los canales GIRK por las proteínas Gβγ [He *et al.* 1999]. Esta leucina elimina la activación de los canales GIRK inducida por el

receptor (dependiente del agonista), mientras que la corriente basal (independiente del agonista) no es afectada [He *et al.* 1999]. El grupo de Logothetis trabajando con los canales homotetraméricos mutantes del poro (GIRK1F137S y GIRK4S143T) identificó que un residuo de histidina (H) localizado en la región amino terminal (H57 en GIRK1 y H64 en GIRK4) y un residuo de leucina en la carboxilo terminal (L262 en GIRK1, L268 en GIRK4), controlan la actividad de los canales GIRK mediada por las proteínas G $\beta\gamma$ ; es decir, tanto la actividad basal y la dependiente de la activación de los receptores [He *et al.* 2002]. Estos estudios demuestran que residuos específicos en la región amino y en la carboxilo terminal son indispensables para la activación de los canales GIRK (Esquema 19).

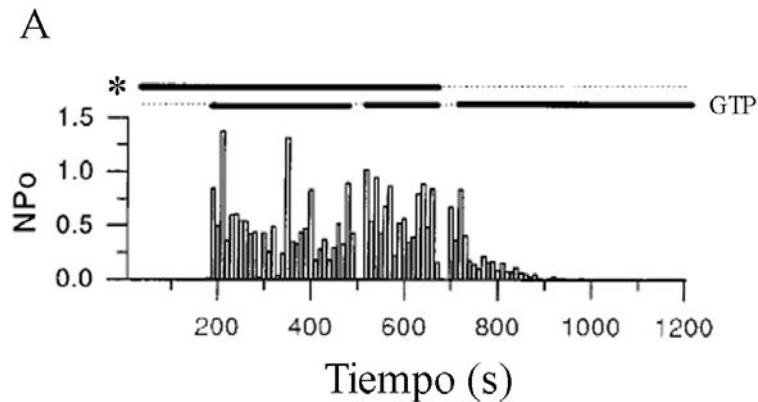
#### **4.3.2. Modulación independiente de las proteínas G.**

Además de la activación mediada por las proteínas G $\beta\gamma$ , los canales GIRK son modulados por factores intracelulares como el fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), el ATP, los iones Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y se ha sugerido que por procesos de oxidación-reducción celular como la hipoxia (Esquema 19 y 20) [Mark y Herlitze, 2000, Sadjja *et al.* 2003]. La modulación de los canales por fosforilación se describirá en un capítulo aparte.

##### **4.3.2.1. Modulación dependiente de PIP<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup>ATP.**

Estudios en miocitos de la aurícula de pollo demuestran que el Mg<sup>2+</sup>ATP intracelular activa a la corriente I<sub>K<sub>ACh</sub></sub> en presencia de ACh o GTP en la pipeta [Sui *et al.* 1998]. Sin embargo, en ausencia de ATP interno la activación inducida por ACh o GTP es transitoria y muestra un decremento en la actividad de los canales dependiente del tiempo, conocido como run down (Esquema 20) [Sui *et al.* 1998]. Así mismo, cuando en lugar de Mg<sup>2+</sup>ATP se agrega PIP<sub>2</sub> se observa el mismo efecto [Sui *et al.* 1998]. Esto sugiere que el ATP y/o el PIP<sub>2</sub> son necesarios en la activación de los canales GIRK.



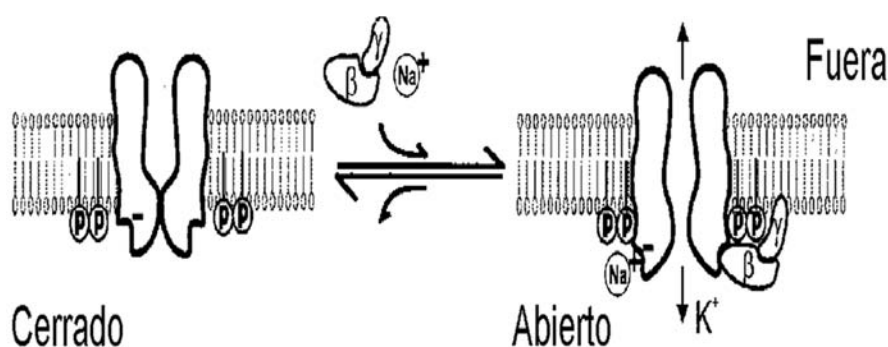


**Esquema 20.** Activación de los canales GIRK por  $Mg^{2+}ATP$ . Parches de miocitos de la aurícula de pollo en la configuración inside-out. En presencia o ausencia de GTP y  $Mg^{2+}ATP^*$  (5 mM). Al agregar PIP2 (5  $\mu M$ ) en lugar del  $Mg^{2+}ATP$  se observa el mismo efecto. [Modificado de Sui *et al.* 1998].

El  $Na^+$  es muy importante en la modulación de los canales GIRK1/GIRK4 mediada por  $Mg^{2+}ATP$  y PIP2. En presencia de  $Na^+$  citosólico y en ausencia de  $Mg^{2+}ATP$  o PIP2 no se observa actividad de los canales GIRK nativos o recombinantes. En contraste, en presencia de  $Na^+$  (20 mM) y  $Mg^{2+}ATP$  (5 mM) o PIP2 (5  $\mu M$ ) se observa un incremento significativo en la actividad de los canales [Sui *et al.* 1998, Huang *et al.* 1998]. La  $EC_{50}$  para el  $Na^+$  fue de aproximadamente de 40 mM [Ho y Murrell-Lagnado 1999a].

La actividad basal del heterotetrámero GIRK1/GIRK2 aumenta significativamente cuando la concentración de PIP2 aumenta [Ho y Murrell-Lagnado 1999b]. En parches de ovocitos que expresan el heterotetrámero GIRK1/GIRK2 se observó que el PIP2 ejerce un efecto mayor en presencia de  $Na^+/Mg^{2+}$  (20 mM/2 mM); la concentración de PIP2 que muestra mayor efecto en presencia de  $Na^+/Mg^{2+}$  fue de 10  $\mu M$ , mientras que en ausencia de  $Na^+/Mg^{2+}$  fue de 50  $\mu M$  [Ho y Murrell-Lagnado 1999b]. En conclusión el  $Na^+$ , el  $Mg^{2+}ATP$  y el

PIP2 son moduladores importantes de la actividad de los canales GIRK. Además, la activación de los canales GIRK dependiente de  $\text{Na}^+$  involucra la unión directa del ión con un residuo de aspartato en la región carboxilo terminal (D226 en GIRK2). Al neutralizar la carga se promueve la interacción del PIP2 con el canal y por lo tanto su apertura (Esquema 21) [Ho y Murrell-Lagnado 1999a y 1999b]. Además de aumentar la probabilidad de apertura de los canales GIRK el  $\text{Na}^+$  evita el run down [Sui *et al.* 1998].



**Esquema 21.** Modelo de la activación de los canales GIRK por PIP2. En presencia de  $\text{Na}^+$  PIP2 (P) y  $\text{G}\beta\gamma$  los canales GIRK aumentan su probabilidad de apertura. [Modificado de Logothetis y Zhang 1999].

#### 4.2.2.2. Modulación de los canales GIRK por agentes oxido-reductores.

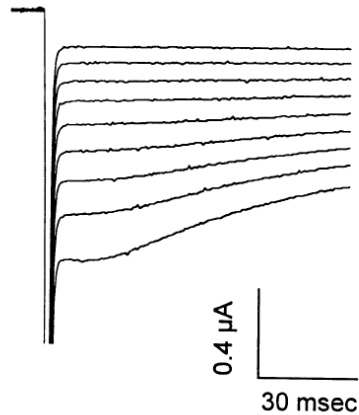
La aplicación extracelular del agente reductor ditioneitol (DTT,  $\text{EC}_{50}$  1.93 mM) activa a los canales GIRK1/GIRK4 sin afectar sus propiedades de permeación o rectificación [Zeidner *et al.* 2001]. Se ha mencionado que la activación dependiente de DTT implica un proceso delimitado a la membrana [Zeidner *et al.* 2001, Sadja *et al.* 2003]. Un residuo de cisteína (C53 en GIRK1 y C60 en GIRK4) localizado en la región amino terminal es esencial para la activación de los canales GIRK por DTT. Cuando este residuo se elimina sólo la activación de los canales GIRK mediada por el receptor permanece sin cambio [Zeidner *et al.* 2001]. Estos resultados

sugieren que los procesos intracelulares de oxidación reducción (hipoxia y algunas condiciones de isquemias) pueden estar implicados en la activación de los canales GIRK de una manera independiente del receptor favoreciendo la hiperpolarización de las células [Zeidner *et al.* 2001, Sadja *et al.* 2003].

## 5. Antecedentes.

### 5.1. El Canal GIRK5.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V y VI, son el sistema de expresión heteróloga más utilizado. Este sistema ha permitido la expresión y estudio de diversos tipos de canales iónicos, transportadores y receptores membranales.



**Esquema 22.** *La corriente de K<sup>+</sup> rectificadora entrante de los ovocitos de la rana Xenopus.* Corriente endógena evocada tras la aplicación de pulsos de voltaje de -160 a -40 mV. La solución de registro con 118 mM de K<sup>+</sup> [Tomada de Salvador *et al.* 2001].

Los ovocitos expresan un gran número de proteínas endógenas en los que se encuentran algunos canales iónicos. Las corrientes endógenas principales incluyen a las de Cl<sup>-</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> [Miledi 1982], de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje [Miledi 1982, Barish 1983], de potasio del tipo rectificador tardío [Lu *et al.* 1990] y de potasio del tipo rectificador entrante [Bauer *et al.* 1996]. Bauer y colaboradores (1996) describieron las propiedades de la corriente endógena de K<sup>+</sup> rectificadora

entrante en los ovocitos de la rana *Xenopus*. Esta corriente presenta características únicas. La corriente rectificadora entrante muestra que a voltajes hiperpolarizantes se induce un incremento de la conductancia de  $K^+$  seguida por una inactivación (Esquema 22). Se ha observado que la amplitud de la corriente endógena varía de 0.2 a 1.5  $\mu A$  y en algunos lotes de ovocitos es difícil detectarla [Bauer *et al.* 1996]. Esta corriente rectificadora entrante de los ovocitos presenta baja sensibilidad al bloqueo por  $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$  y 4-amino piridina [Bauer *et al.* 1996, Salvador *et al.* 2001 y 2003, Mora y Escobar 2005].

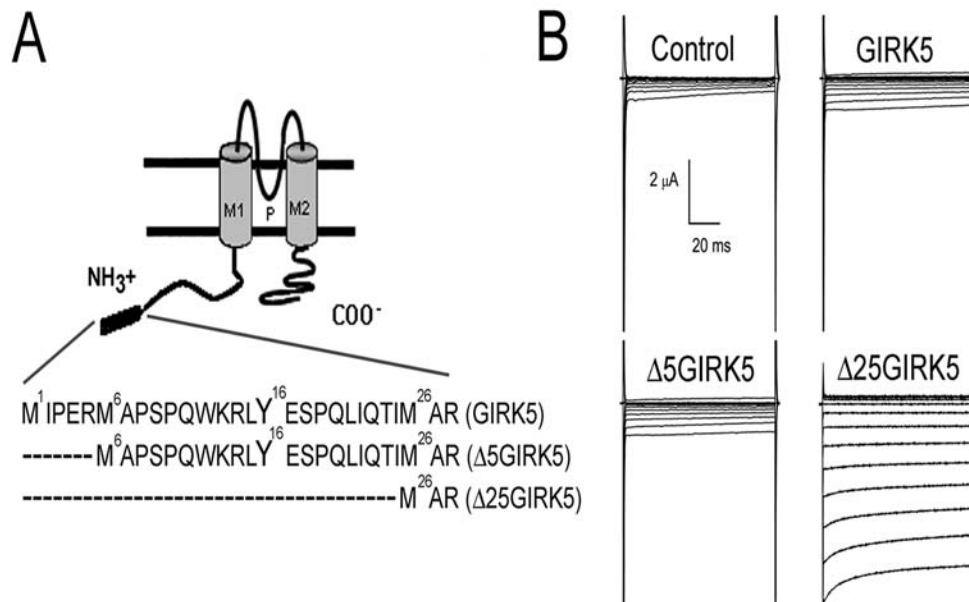
En 1996 el grupo de Clapham reportó la clonación del canal de potasio rectificador entrante endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus*, Kir 3.5 o GIRK5 (XIR). La secuencia de aminoácidos del canal GIRK5 presenta un 78% de identidad con el canal GIRK4, 72% con GIRK2, 68% con GIRK3 y solo el 56% con el canal GIRK1 [Hedin *et al.* 1996]. La región codificante (ORF) del ADN para el canal GIRK5 consta de 1200 pares de bases (pb). Se ha reportado que el sitio de iniciación de una proteína depende del contexto en la que se encuentre el codon AUG [Kozak 1999]. Si el codon AUG se encuentra flanqueado por una adenosina o una guanina (A o G) en la posición -3 y una guanina o citosina en la posición +4, este codon se clasifica como un sitio de iniciación fuerte [Kozak 1999]. En resumen, cuando el ribosoma eucariótico escanea el ARNm y reconoce varios codones AUG, la iniciación de la proteína será a partir del codon AUG que se localice en el contexto  $xG/AxxAUGxxxG/Cx$ , donde x es cualquier base [Kozak 1999]. Los codones AUG que no se encuentran flanqueados por la adenina o guanina en la posición -3' (-3') o la guanina o citosina en +4' se logran traducir en menor proporción [Kozak 1999]. El sitio más probable de iniciación del gen del canal GIRK5 no es claro ya que el canal presenta la posibilidad de tres sitios de iniciación, los dos primeros se encuentran dentro de un contexto fuerte con una A en la posición -3' y una C en la +4' del codon AUG (Esquema 23); el tercer codon difiere en la posición +4' ya que posee una A en lugar de G/C (Esquema 23).

5'gaataca**A**ag**ATG**att**C**ctgaa**A**ga**ATG**gca**C**caagtcctcagtggaagat  
tgtatgagtcaccacaactcatccaaacc**A**tc**ATG**gca**A**ggga.....3'

**Esquema 23.** *Región inicial de la secuencia del ADN del gen del canal GIRK5.* Las bases en negritas representan el sitio de iniciación (ATG) y las bases en la posición -3 y +4.

Al traducirse estos codones de iniciación darían lugar a tres proteínas cuya diferencia radica principalmente en la longitud de la región amino terminal (metionina 1, 6 y 26; Esquema 24A). En el laboratorio se obtuvieron las tres isoformas del canal GIRK5 (GIRK5,  $\Delta$ 5GIRK5 y  $\Delta$ 25GIRK5; Esquema 24) y se estudió la expresión funcional de cada homomultímero en los ovocitos de la rana *Xenopus*. Únicamente la isoforma más corta fue funcional (Esquema 24B) [Salvador *et al.* 2001 y 2003]. La corriente de potasio rectificadora entrante del canal  $\Delta$ 25GIRK5 en los ovocitos presenta inactivación y se bloquea por Ba<sup>2+</sup> externo en forma independiente del voltaje (EC<sub>50</sub> =102  $\mu$ M) [Salvador *et al.* 2001].

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de las tres isoformas GIRK5 y  $\Delta$ 5GIRK5 (Esquema 24A), observamos que en los primeros 25 aminoácidos se encuentra un residuo de tirosina (Y16) que se ubica dentro de una secuencia probable de fosforilación (I/L-Y-D/E-X-L) [Schmitz *et al.* 1996]. De estos resultados surgen varias preguntas ¿Que papel juega la Y16 en la expresión funcional de los canales GIRK5? ¿La fosforilación de la Y16 evita que los canales sean funcionales? Si es así ¿Cuál es el mecanismo?.



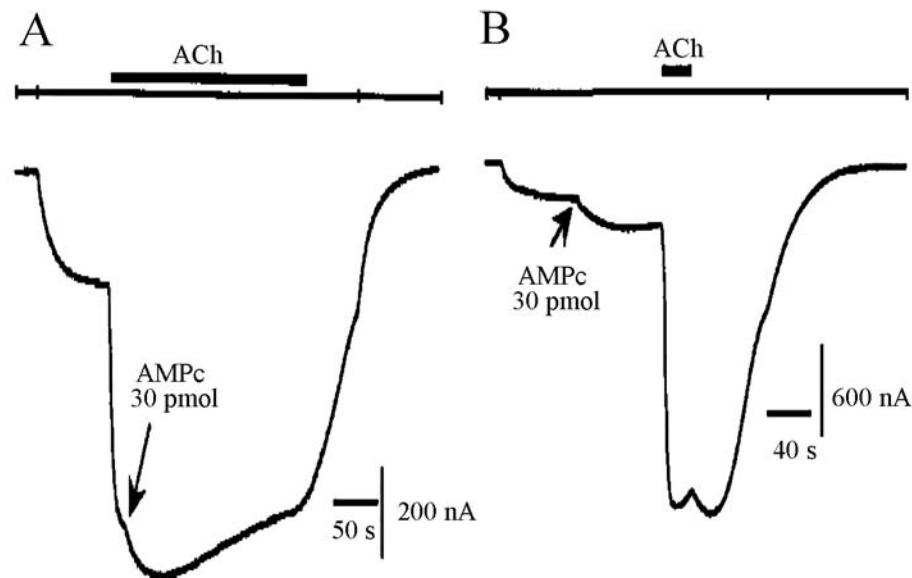
**Esquema 24.** Las isoformas del canal *GIRK5*. A) Secuencia de aminoácidos en la región amino terminal de las tres isoformas del canal *GIRK5*. Las isoformas *GIRK5* y  $\Delta 5$ *GIRK5* muestran un residuo de tirosina dentro de una secuencia consenso de fosforilación (Y16). B) Registros de la corriente de los ovocitos inyectados con agua y con el ARNc de las tres isoformas del canal *GIRK5*. El protocolo de pulsos fue de -160 a +40 mV con pasos de 20 mV, con una duración de 100 ms y a un potencial de mantenimiento de 0 mV. La solución de registro con 118 mM de K<sup>+</sup>.

## 6. El papel de la fosforilación en los canales de potasio.

### 6.1. Regulación de los canales de potasio por proteína cinasa A y C.

La fosforilación y la desfosforilación de los canales iónicos puede modificar su actividad y alterar las propiedades eléctricas de las células [Davis *et al.* 2001, Tiran *et al.* 2003]. Algunos canales iónicos son regulados por las proteínas cinasas A y C (PKA, PKC) que fosforilan residuos de serinas (S) y treoninas (T) [Ismailov y Benos

1995]. La corriente de potasio tipo M (KCNQ2/3) se suprime a través de la activación de los receptores unidos a las proteínas  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ , lo que produce un incremento en la actividad neuronal [Hoshi *et al.* 2003]. Cuando se activa a las proteínas heterotriméricas  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  se activa a la fosfolipasa  $C\beta$ , esta última provoca la hidrólisis de PIP2 y activa a la PKC [Wettschureck y Offermanns 2005]. Cuando se inhibe a la PKC con estaurosporina (10  $\mu$ M), no se observa decremento en la corriente M cuando se activa al a proteína  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  [Shapiro *et al.* 2000, Hoshi *et al.* 2003]. Estos resultados sugieren que la PKC es la que induce la inhibición de la corriente M neuronal [Hoshi *et al.* 2003].



**Esquema 25.** Efecto de la PKA en la corriente  $I_{K_{ACh}}$ . Registro de los ovocitos que expresan al heterotetrámero GIRK1/GIRK4 y el receptor  $AChm_2$ . Los registros se realizaron en alto potasio (90 mM) a -180 mV. Las curvas muestran el efecto de la aplicación de AMPc después (A) y antes (B) de perfundir a la célula con acetilcolina (ACh). La aplicación del AMPc induce la activación de la PKA. [Modificado de Mullner *et al.* 2000].



Al activar a la PKC con calfofostina C se inhibe a la corriente de potasio de baja conductancia (SK) en las células del túbulo colector cortical [Wang *et al.* 1993]. El canal Kir 1.1 es el componente principal de la corriente SK [Wang *et al.* 1993]. Se identificó que las serinas S4 y S201 en el canal Kir 1.1 son el sustrato de la PKC; al mutar estos aminoácidos por un residuo de aspartato (Kir 1.1S4D/201D) la corriente rectificadora entrante no se inhibió al activar a la PKC con 200 nM de calfofostina C [Lin *et al.* 2002].

Los canales GIRK también son el blanco de la PKA y PKC. Se ha observado que la PKA aumenta la corriente del heterotetrámero GIRK1/GIRK4 (Esquema 25) [Mullner *et al.* 2000]. Este aumento de la actividad en los canales GIRK es dependiente de las proteínas G $\beta\gamma$  (Esquema 25)[Mullner *et al.* 2000]. Se ha sugerido que el papel de la PKA en los canales GIRK es la de facilitar la probabilidad de apertura de los canales [Mullner *et al.* 2000]. El sitio específico de fosforilación no se ha identificado, pero se encontró que únicamente el canal GIRK1 es el que se fosforila en el heterotetrámero GIRK1/GIRK4 [Medina *et al.* 2000]. La región crítica de fosforilación del canal GIRK1 se encuentra entre los aminoácidos del 373 al 419 [Medina *et al.* 2000].

Mientras que la acción de la PKA en los canales GIRK es la de aumentar la actividad de los canales mediada por proteínas G $\beta\gamma$ , la PKC los inhibe [Takano *et al.* 1995, Hill y Peralta 2001, Mao *et al.* 2004]. La activación del receptor muscarínico m1 activa a su vez a la fosfolipasa C $\beta$  lo que provoca la hidrólisis del PIP2 y la activación de la PKC [Hill y Peralta 2001, Leaney *et al.* 2001]. Se ha demostrado que los canales GIRK se inhiben cuando se activa a la PKC con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y se restaura cuando se activan a las fosfatasa [Takano *et al.* 1995, Hill y Peralta 2001, Leaney *et al.* 2001]. La inhibición de la corriente de los canales GIRK por PKC se da a través de la fosforilación de una serina localizada en la región del carboxilo terminal, S185 en el canal GIRK1 y S191 en el canal GIRK4 [Mao *et al.* 2004].

## **6.2. Regulación de los canales de potasio por cinasas de tirosinas.**

También los canales de potasio son regulados por las cinasas de tirosinas (PTKs) [Davis *et al.* 2001]. Las PTKs fueron descubiertas como los productos de diversos oncogenes [Hunter y Cooper 1985]. Sin embargo, se ha visto que las PTKs son indispensables en la traducción de diversas señales extracelulares que median eventos como la proliferación celular, el arreglo del citoesqueleto y la coordinación de varias respuestas fisiológicas [Davis *et al.* 2001]. Las PTKs pueden ser del tipo receptor, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento endotelial (VEGF) [Fantl *et al.* 1993]. También se encuentran las del tipo no receptor, como la gran familia Src. Esta es la familia de las cinasas de tirosina del virus del sarcoma de Rous; cuenta con ocho miembros, la Src, Fin y Yes se expresan ubicuamente, mientras que Lck, Hck Fgr, Lyn y Blk presentan un patrón de expresión restringido [Davis *et al.* 2001].

La actividad de las PTKs es contrarrestada por las proteínas fosfatasas de tirosinas (PTPs). Estas proteínas también se pueden encontrar del tipo receptor y del tipo no receptor, y coexisten en las células regulando los procesos de señalización y proliferación celular [Davis *et al.* 2001].

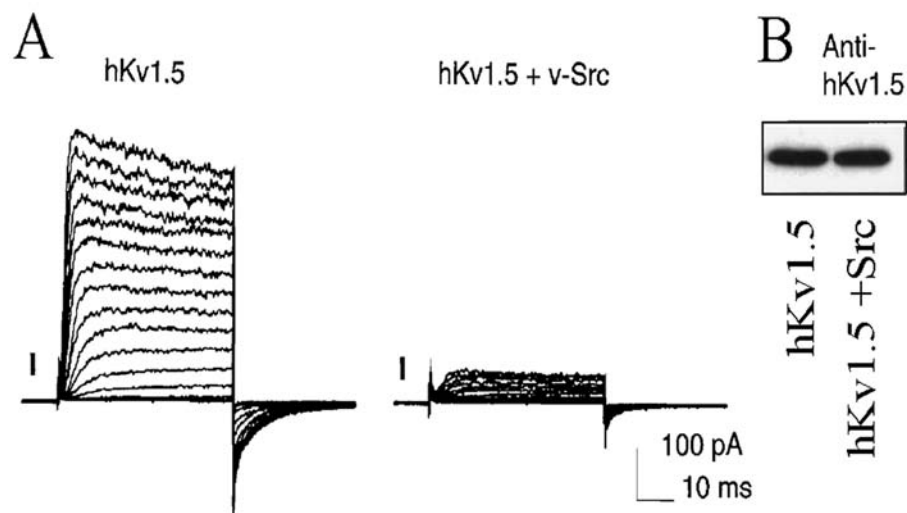
Las observaciones iniciales sobre la regulación de los canales de potasio por fosforilación en residuos de tirosinas se basaron en los efectos producidos por la utilización de los inhibidores de PTKs y PTPs [Davis *et al.* 2001]

### **6.2.1. Efecto de las PTKs en los canales Kv.**

En los canales Kv tipo Shaker (Kv1.2) se encontró que el receptor muscarínico m1 induce la supresión de la corriente [Huang *et al.* 1993]. Se ha observado que al mutar la Y132 por fenilalalina (Y132F) en el canal Kv1.2 se elimina la inhibición de la corriente cuando el receptor muscarínico m1 se activa [Huang *et al.* 1993, Hattan *et al.* 2002]. Este efecto también se ha observado al coexpresar los canales Kv1.2 con

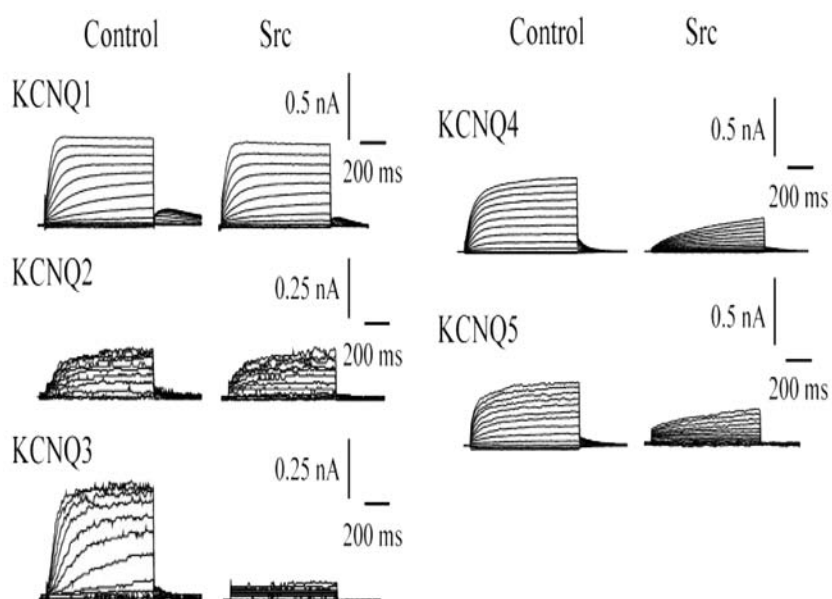
el receptor EGF o la proteína piruvato cinasa 2 (PYK2), una tirosina cinasa del tipo no receptor en las células HEK 293 [Davis *et al.* 2001]. El mecanismo de la inhibición de la corriente de los canales Kv 1.2 no está del todo claro pero se sugiere que la activación del receptor M1 pueda activar a un tipo de PTK [Huang *et al.* 1993, Hattan *et al.* 2002].

En el canal Kv1.5 se encontró que al coexpresarlo con una PTK, la v-Src, la corriente de los canales se suprime (Esquema 26). Además se observó que la disminución de la corriente no se debe a una menor expresión de la proteína en la membrana plasmática [Holmes *et al.* 1996a]. Se ha sugerido que la proteína Src interactúa directamente con el canal a través de un dominio rico en prolina semejante al sitio de unión identificado en las proteínas Src, el dominio SH3 [Holmes *et al.* 1996b].



**Esquema 26.** Efecto de la proteína Src en los canales hKv1.5. A) Registro de la corriente del canal Kv 1.5 en células HEK 293 con y sin la coexpresión de la proteína Src. B) Inmunoblot del lisado celular utilizando el anticuerpo anti Kv1.5. [Modificada de Holmes *et al.* 1996b].

La coexpresión de los canales Kv1.3 con el receptor EGF o la proteína cinasa de tirosina viral Src (v-Src) en células HEK 293, induce la disminución de aproximadamente el 95% de la corriente total [Holmes *et al.* 1996a, Bowlby *et al.* 1997, Cook y Fadool 2002]. Esta coexpresión induce la fosforilación del canal y produce cambios únicamente en la cinética de activación e inactivación pero no afecta su densidad en la membrana celular [Fadool. *et al.* 1997, Cook y Fadool 2002]. La fosforilación de los canales Kv1.3 por la v-Src ocurre tanto en la región del amino (Y137) como en la del carboxilo ( Y220, Y221, Y304 y Y449) [Cook y Fadool 2002].



**Esquema 27.** Efecto de la tirosina cinasa Src en los canales Kv 7.x (KCNQ). Registros de la corriente de células CHO individualmente transfectadas con el ADNc de los canales Kv 7.1 al Kv7.5 (KCNQ1–5; control) o transfectadas con el ADNc de la proteína Src como se indica en el esquema. Las corrientes fueron evocadas utilizando un protocolo de pulsos de 500 ms de duración y un potencial de mantenimiento de -60 mV. Los pasos de voltaje fueron de -80 a +40 mV en incrementos de 10 mV [Tomada de Gamper *et al.* 2003].

Al coexpresar a la proteína cinasa de tirosina c-Src con los canales del tipo Kv7 (KCNQ) en las células CHO se inhibe la corriente de los canales homoméricos Kv7.3 (KCNQ3), Kv 7.4 (KCNQ4) y Kv 7.5 (KCNQ5; Esquema 27) y la de los canales del heterotetrámero Kv 7.2/Kv 7.3 (KCNQ2/ KCNQ3) [Gamper *et al.* 2003]. En contraste, la corriente de los homotetrámeros KCNQ1 y KCNQ2 no se modifica por la coexpresión de la Src en éstas células (Esquema 27) [Gamper *et al.* 2003].

También la corriente nativa M de las neuronas simpáticas de la rata se ve afectada por la acción de la Src [Gamper *et al.* 2003]. La proteína Src no sólo provoca el decremento de la amplitud de la corriente, también retarda la cinética de activación de estos canales. Al igual que en los canales Kv1.3 y Kv1.5 la densidad de los canales en la membrana no se afecta.

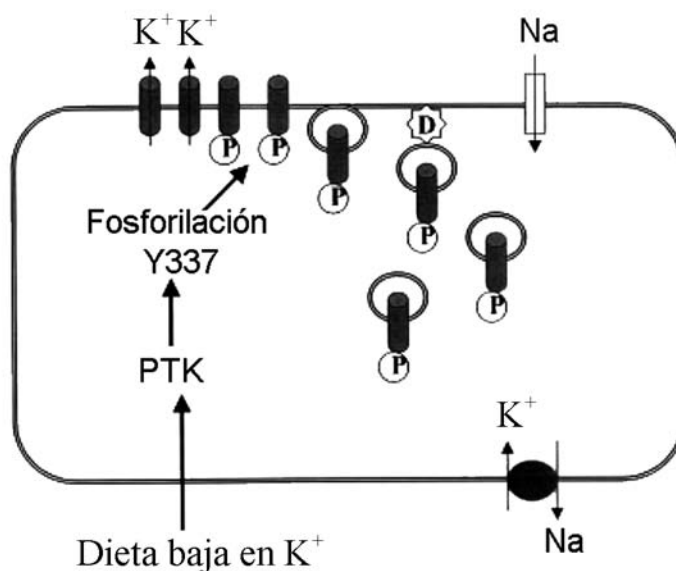
## **6.2.2. Regulación de los canales Kir por PTKs.**

### **6.2.2.1. La subfamilia Kir 1.**

Los canales de potasio de la subfamilia Kir no están exentos de ser regulados por la fosforilación en residuos de tirosinas. El canal renal Kir1.1 (ROMK1) que se expresa en la membrana apical del túbulo colector cortical es esencial para el reciclamiento del potasio.

La ingesta de potasio regula la expresión funcional de los canales Kir 1.1; una dieta alta en potasio (10%) aumenta la corriente rectificadora entrante en las células del túbulo colector cortical mientras que una dieta libre de potasio la reduce [Wang *et al.* 2000 y 2002, Wei *et al.* 2001]. El bajo contenido de potasio en la dieta induce la fosforilación de la tirosina 337 (Y337) localizada en la región carboxilo terminal del canal Kir 1.1, [Moral *et al.* 2001, Lin *et al.* 2002, Wang *et al.* 2002, Sterling *et al.* 2002]. La fosforilación de la Y337 en el canal Kir 1.1 (ROMK1) inhibe la corriente al disminuir la densidad de los canales en la membrana celular sin modificar sus propiedades biofísicas [Moral *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Sterling *et al.* 2002]. Los

canales se endocitan en forma dependiente de la dinamina, una proteína del citoesqueleto (Esquema 28) [Sterling *et al.* 2002 ].

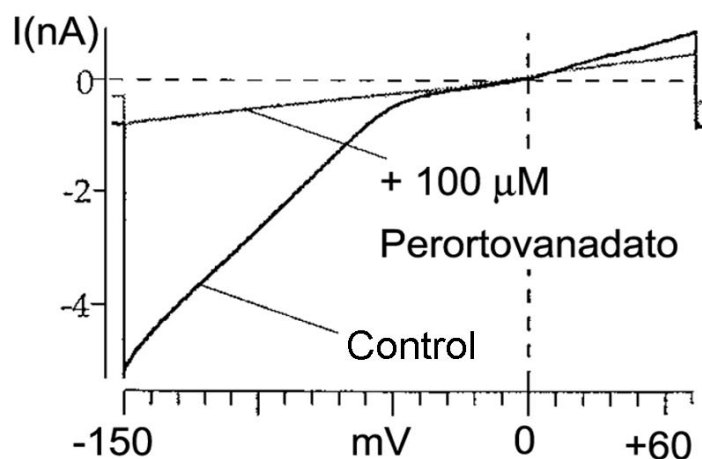


**Esquema 28.** Modelo del Efecto de la ingestión de potasio en los canales Kir 1.1. La dieta baja en potasio ( $K^+$ ) induce la fosforilación (P) de la tirosina 337 (Y337) en el canal Kir 1.1 por una cinasa de tirosina (PTK). La fosforilación (P) del canal induce su endocitosis dependiente de dinamina (D). [Modificado de Sterling *et al.* 2002 ].

#### 6.2.2.2. La subfamilia Kir 2.1.

Las corrientes del canal Kir 2.1 endógenas y las recombinantes (en células tsA 201 y COS 7) se suprimen al inhibir a las fosfatasas de tirosinas (PTPs) con perortovanadato de  $Na^+$  y se restablecen cuando las PTKs se inhiben con genisteína (Esquema 29) [Wischmeyer *et al.* 1998]. Esto mismo se ha observado cuando los canales Kir 2.1 se coexpresan con dos cinasas de tirosinas, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGFR) o el receptor EGF. La tirosina Y242 en el canal Kir 2.1 es el blanco de las PTKs. Una mutación puntual de la Y242 por fenilalanina (F)

evita la inhibición de los canales Kir 2.1 por las PTKs [Wischmeyer *et al.* 1998]. La disminución de la corriente esta asociada con el decremento de la capacitancia de la membrana, lo que implica que al igual que en los canales Kir 1.1 la fosforilación de la Y242 en los canales Kir 2.1 induce su endocitosis [Tong *et al.* 2001].

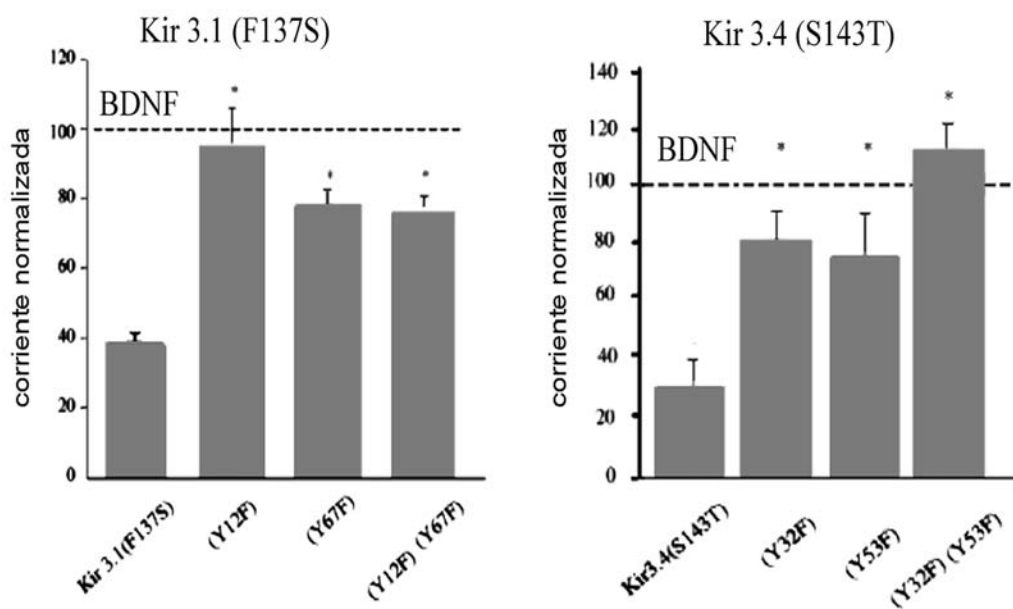


**Esquema 29.** Efecto del perortovanadato de  $\text{Na}^+$  en el canal Kir 2.1. Registro de la corriente de las células tsA-201 transfectadas con el ADNc del canal Kir 2.1 en respuesta a rampas de -150 a + 60 mV con una duración de 500 ms. Antes (control) y después de la aplicación del perortovanadato (100  $\mu\text{M}$ ) [Modificada de Wischmeyer *et al.* 1998].

### 6.2.2.3. La subfamilia Kir 3 (GIRK).

También los canales GIRK (Kir 3) son modulados por la fosforilación en residuos de tirosinas. En los canales mutantes GIRK1F137S y GIRK4S143T que forman homotetrámeros funcionales se estudió el efecto de la fosforilación en los residuos de tirosinas (Esquema 30). La cianasa de tirosina TrkB del tipo receptor induce la inhibición de la corriente en estos canales a través de la fosforilación de las tirosinas Y12 y Y67 para el canal GIRK1, y Y32 y Y53 para el canal GIRK4; al mutar estas tirosinas por fenilalanina (GIRK1Y12F, GIRK1Y67F, GURK4Y32F y

GIRK4Y53F) no se inhibió la corriente rectificadora entrante cuando se activó a la tirosina cinasa TrkB con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Esquema 30) [Rogalski *et al.* 2000]. Se ha propuesto que la fosforilación de los residuos de tirosinas (Y32 y Y53 en GIRK4) pone al descubierto a los aminoácidos glutamina (Q28 y Q51 en GIRK4) y a la arginina (R30 y R52 en GIRK4) que forman un dominio catalítico GAP, lo cual induce la hidrólisis del GTP y, por lo tanto, la disminución de las proteínas G $\beta\gamma$  libres [Ippolito *et al.* 2002].



**Esquema 30.** Efecto de la fosforilación de tirosinas en los canales Kir 3 (GIRK). Corriente normalizada de los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales Kir 3 (mostrados en la figura) y la tirosina cinasa TrkB del tipo receptor. El receptor fue activado con 200 ng/ml del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Las mutaciones de las tirosinas evita la inhibición de los canales homoméricos (Y12F y Y67F para el canal Kir 3.1, y, Y32F y Y53F para el canal Kir 3.4). Registros a -80 mV con una solución externa de 24 mM de K<sup>+</sup> [Modificada de Rogalski *et al.* 2000].



## 7. Planteamiento del problema.

El canal GIRK5 se clonó a partir de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Hedin et al. 1996]. El gen del canal GIRK5 presenta tres sitios probables de iniciación de la traducción [Kosak 1999] Esto daría lugar a tres isoformas GIRK5,  $\Delta 5$ GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5, la diferencia es en la longitud de la región amino terminal. Se ha observado que los homotetrámeros del canal GIRK5 no conducen [Hedin et al. 1996, Salvador et al. 2001 y 2003]. Al igual que los canales GIRK5 el homotetrámero del canal GIRK1 no conduce [Krapivinsky et al. 1995, Hedin et al. 1996]. Sin embargo la coexpresión del heterotetrámero GIRK1/GIRK5 produce corrientes de potasio rectificadoras entrantes inducidas a través de la activación del receptor AChm2 [Hedin et al. 1996]. Al igual que la isoforma GIRK5 los homotetrámeros de  $\Delta 5$ GIRK5 no conducen. Sorpresivamente, en los ovocitos de la rana *Xenopus*, la isoforma  $\Delta 25$ GIRK5 muestra que la corriente basal registrada, utilizando una solución alta en potasio (118 mM), sobrepasa los 5  $\mu$ A a -160 mV [Salvador et al. 2001, 2003]. ¿Dado que la única diferencia entre este canal y el  $\Delta 25$ GIRK5 es que el canal GIRK5 presenta 25 aminoácidos más en la región amino termina por qué el canal GIRK5 no es funcional? La única l. Entre estos 25 aminoácidos hay un residuo de tirosina, (Y16), dentro de una secuencia probable de fosforilación (I/LYD/EXL) [Schmitz et al. 1996]. Es probable que la fosforilación de la Y16 sea la que determine la expresión funcional de los canales GIRK5. Se sabe que la fosforilación y la desfosforilación de los canales iónicos en residuos de tirosinas puede modificar su actividad y de esa manera alterar las propiedades eléctricas de las células [Davis et al. 2001, Tiran et al. 2003]. En el caso particular de los canales de potasio se ha observado que la fosforilación de algunos residuos de tirosinas provoca la disminución de la corriente [Fadool. et al. 1997, Moral et al. 2001, Tong et al. 2001, Cook y Fadool 2002, Lin et al. 2002, Sterling et al. 2002, Wang et al. 2002, Gamper et al. 2003 ]. Por lo anterior, es probable que al estar fosforilada la Y16 en los canales GIRK5 se inhiba su función. Si este es el caso, es

importante conocer el mecanismo por el cual la fosforilación de la Y16 inhibe la función de los canales GIRK5. Hasta la fecha se han descrito tres mecanismos por los cuales la fosforilación de residuos de tirosinas inhibe la corriente de los canales de potasio. En el primer mecanismo propuesto, la fosforilación de residuos de tirosinas provoca la disminución de la probabilidad de apertura de los canales (Kv 1.3, Kv1.5 y Kv 7.2-5) [Holmes et al. 1996b, Fadool. et al. 1997, Cook y Fadool 2002, Gamper et al. 2003]; en el segundo, la fosforilación provoca la disminución de la densidad de los canales en la membrana plasmática (Kir 1.1 o Kir 2.1) [Moral et al. 2001, Tong et al. 2001, Lin et al. 2002, Wang et al. 2002, Sterling et al. 2002]. El tercer mecanismo, propuesto para los canales GIRK, consiste en que la fosforilación de tirosinas promueve la disminución de las proteínas G $\beta\gamma$  libres que activan a los canales GIRK1 y GIRK4 [Ippolito et al. 2002]. Probablemente, la fosforilación de la Y16 inhibe la corriente del canal GIRK5 mediante alguno de estos tres mecanismos.

Por lo anterior, el propósito de este estudio en particular fue determinar el papel de la fosforilación en la expresión funcional de los canales GIRK5.

## **8. Hipótesis.**

Si la falta de función de los canales GIRK5 se debe a que la fosforilación de la Y16 evita que los canales lleguen a la membrana entonces al inhibir a las cinasas de tirosina endógenas o al mutar a la tirosina 16 por un residuo no fosforilable como la alanina se favorecerá la expresión funcional de los canales GIRK5 en la membrana plasmática.

## 9. Objetivos.

### 9.1. Objetivo general.

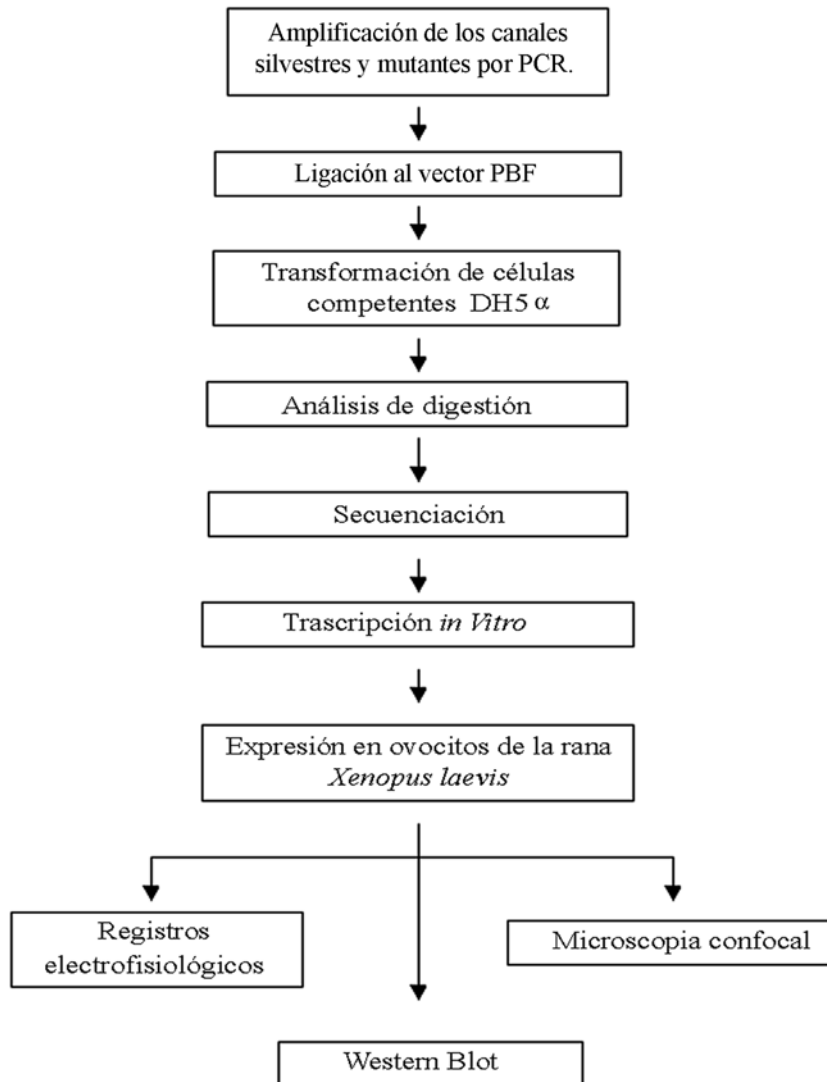
Determinar el papel de la fosforilación de la tirosina 16 (Y16) en la expresión funcional de los canales GIRK5.

### 9.2. Objetivos particulares.

- Expresar las tres isoformas del canal GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus*.
- Comprobar si la concentración de ARNc inyectado en los ovocitos tiene efecto en el nivel de expresión de los canales GIRK5.
- Estudiar el efecto de la isoforma GIRK5 en la expresión del canal  $\Delta 25$ GIRK5.
- Determinar el papel de la fosforilación de la Y16 en expresión funcional de los canales GIRK5 en los ovocitos.
  1. Mutar la Y16 por un aminoácido no fosforilable en el canal GIRK5 (GIRK5Y16A).
  2. Incubar con los inhibidores de las cinasas de tirosina genisteína y geldanamicina.
- Determinar si la fosforilación de la Y16 inhibe la expresión de los canales GIRK5 en la membrana plasmática.
  1. Mediante la microscopía confocal.
  2. Mediante Western Blott
- Determinar la afinidad al  $Ba^{2+}$  externo ( $EC_{50}$ ) en los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5.
- Estudiar la activación por el dímero  $G\beta\gamma$  en los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 acoplados al receptor muscarínico m2 (AChm<sub>2</sub>).
- Comparar la expresión funcional de los tetrámeros del canal GIRK1 con los canales GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5.
- Comprobar si la actividad basal de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 se debe a la poza endógena de proteínas  $G\beta\gamma$  libres en los ovocitos de la rana *Xenopus*.

## 10. Métodos.

La estrategia general a seguir en este trabajo se resume en el esquema 31.



**Esquema 31. Métodos.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental llevada a cabo en este estudio.

## 10.1. Obtención de los diferentes ADNs utilizados.

### 10.1.1. Obtención del ADNc de los canales GIRK5, Δ5GIRK5 y Δ25GIRK5.

La amplificación del ADN complementario (ADNc) de los canales se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, ver apéndice A) [Sambrook *et al.* 1989] utilizando los iniciadores sentido GIRK5, Δ5GIRK5 y Δ25GIRK5 y el iniciador antisentido GIRK5L1 (Tabla 3). La mutación puntual de la Y16 por alanina (Y16A), en los canales GIRK5 y Δ5GIRK5, se realizó mediante la técnica de mutagénesis dirigida y recombinación por PCR [Erlich 1992, Zhu 1997]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los iniciadores mutagénicos Y16As (sentido) y Y16Aa (antisentido). Los oligonucleótidos SP6 (sentido) y el GIRK5L2 (antisentido) se utilizaron como iniciadores de los extremos.

**Tabla 3.** Secuencia de los iniciadores sentido y antisentido utilizados.

Iniciador	5' ..... 3'
GIRK5	AAA GGT CGA CAT GAT TCC TGA AAG AAT GGC
Δ5GIRK5	AAG AGT CGA CAT GGC ACC AAG TCC TCA GTG
Δ25GIRK5	CAT CGT CGA CAT GGC AAG GGA TTT AAG GGT CTC TAT G
Y16As	AAA GAT TGG CTG AGT CAC C
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
GIRK5L1	GAA ATG TAT CAA TGT TTT TCT GCA GTC AGT CTG GCT GTG
GIRK5L2	AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTCGCC TGT ATC AAA G
Y16Aa	GGT GAC TCA GCC AAT CTT T

### 10.1.2. Ligación al vector PBF.

El ADNc de los canales GIRK5, Δ5GIRK5 y Δ25GIRK5 amplificados se ligaron al vector PBF (pRSSP6013A3-UWE) mediante la generación y unión de extremos cohesivos Sal 1 y Pst1 (Invitrogen Life Technologies). La ligación de los ADNcs de los canales mutantes (GIRK5Y16A y Δ5GIRK5Y16A) fue con la enzima Nco1 (Invitrogen). Previamente a la reacción de ligación el vector se incubó con la enzima fosfatasa alcalina (Invitrogen). La reacción se catalizó con la enzima T4 ligasa (Invitrogen) [Sambrook *et al.* 1989].

### **10.1.3. Construcción del ADNc de las proteínas de fusión con la EGFP.**

El ADNc de las proteínas de fusión, EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5, se obtuvo adicionando la región codificante del gen de la proteína verde fluorescente, conocida como EGFP (pEGFP-C1; Clontech), en el extremo 5' del ORF de los canales GIRK5 insertos en el vector PBF.

### **10.2. Transformación.**

El ADNc del receptor AChm<sub>2</sub>, el de la proteína EGFP (pEGFP-C1), el de la proteína G $\alpha_{i2}$ , el de los canales GIRK1, GIRK4 y el de todos los canales GIRK5 se transformaron en células competentes DH5 $\alpha$  (ver apéndice A) y se incubaron en medio LB con el antibiótico apropiado (ver apéndice A). El ADNc (plásmido) se purificó con el kit Concert Nucleid Acid Purification Sistem (Invitrogen, life technologies) para cultivos de bacterias de 5 ml (miniprep) y Plasmid Maxi Prep Kit (Qiagen) para cultivos de bacterias de 100 ml a 500 ml (maxiprep). Los ensayos de digestión con enzimas de restricción se utilizaron para comprobar la dirección de 5' a 3' del ADNc de cada canal inserto en el vector.

### **10.3. Secuenciación.**

Todas las clonas se secuenciaron con la técnica de secuenciación automatizada por electroforesis capilar utilizando el equipo AB1 Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

### **10.4. Transcripción *in vitro*.**

El ARNm complementario (ARNc) se sintetizó con el kit mMessage mMachine (Ambion Corporation, Austin, TX) siguiendo las especificaciones del proveedor. El ARNc del receptor muscarínico m2 (AChm<sub>2</sub>) y el del canal GIRK1 se sintetizaron con la enzima T7 ARN polimerasa, el del canal GIRK4 con la T3 ARN polimerasa. El ARNc de todas las

variantes del canal GIRK5 y el de la proteína  $G\alpha_{12}$  se sintetizaron con la enzima SP6 ARN polimerasa.

Nota: Los diferentes ADNc y ARNc se analizaron en geles de agarosa al 1% (ver apéndice A). La concentración de los ácidos nucleicos en solución se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm. La absorbancia a 280 nm se utilizó para determinar la pureza de los ácidos nucleicos mediante la relación de la absorbancia obtenida a 260 entre la obtenida a 280 nm.

## **10.5. Expresión de los canales en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.**

### **10.5.1. Obtención de los ovocitos.**

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V-VI se obtuvieron por ovariectomía parcial. Los ovocitos se desfolicularon mediante una digestión enzimática con colagenasa tipo 1A (2mg/ml; Sigma, St. Louis, MO). Los ovocitos se mantuvieron a 18 °C en medio ND96 (En mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 2.5 Piruvato, 0.05 mg/ml de gentamicina, pH 7.4).

### **10.5.2. Microinyección.**

Los ovocitos se microinyectaron con 50 nl de ARNc (de 5 a 25 ng por ovocito). Los ovocitos inyectados con 50 nl de agua fueron utilizados como control.

## **10.6. Registros electrofisiológicos.**

Dos a cuatro días después de la microinyección, los ovocitos se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp). Se utilizó un convertidor analógico digital (DIGIDATA 1322A), un amplificador Geneclamp 500B, el software pClamp 8.0 (todos de Axon Instruments Inc. Foster City, CA), y una PC pentium III (Intel) para la adquisición de los registros. Las corrientes totales se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de 12 pulsos, cada uno con una duración de 100 ms a un potencial de mantenimiento de 0 mV. Los

pasos de voltaje aplicados fueron desde -160 mV a + 60 mV. Los ovocitos se empalaron con dos microelectrodos con resistencias de 0.5 a 2 MΩ. Las pipetas de registro se llenaron con una solución 3 M de KCl. Una solución alta en potasio se utilizó como medio de registro (En mM: 118 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH 7.4). 10 mM de carbacol (cloruro de carbamil colina; Sigma) se adicionó a la solución de registro para activar al receptor AChm<sub>2</sub>. La adquisición de los datos y el análisis de los registros se realizaron con el software pClamp 8.0.

### **10.7. Microscopía confocal.**

Los ovocitos inyectados con 20 ng de ARNc de los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP-Δ25GIRK5 se analizaron mediante la técnica de microscopía confocal y fijación de voltaje con dos microelectrodos. La fluorescencia de la proteína EGFP fue excitada a 480 nm y observada a 10X con un microscopio invertido (Nikon TMD 300). La emisión fluorescente emitida se colectó con un filtro de emisión de 522 nm. El escaneo XY se obtuvo aproximadamente en la región media de cada ovocito. Se obtuvo la señal de seis secciones de la membrana para cada ovocito y se promedió.

### **10.8. Ensayos de inhibición de las proteínas cinasas de tirosinas endógenas de los ovocitos.**

Los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales GIRK5, GIRK5Y16A, Δ25GIRK5 y EGFP-GIRK5 se incubaron en medio ND96 con dos inhibidores inespecíficos de las proteínas cinasas de tirosina, genisteína (20 mM) o geldanamicina (75 nM) (Alomone Labs, Israel) disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO; Baker). Posteriormente, los ovocitos, se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos previamente descrita. Después de la incubación, únicamente los ovocitos que expresan el canal EGFP-GIRK5 se



analizaron conjuntamente con técnica de la microscopia confocal. La concentración final de DMSO aplicada a los ovocitos fue menor de 0.02%.

### **10.9. Detección de las proteínas de fusión con la técnica de Western Blott.**

Para obtener las fracciones de la membrana los ovocitos inyectados con las proteínas de fusión EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 se homogeneizaron y por centrifugación diferencial se obtuvieron las fracciones de las membranas de alta densidad (membrana plasmática) y las de baja densidad (vesículas intracelulares, ver apéndice A) [Marples *et al.* 1995, JongUn *et al.* 2001] Las proteínas de la fracción de la membrana plasmática correspondiente a 10 ovocitos se separaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% [Sambrook *et al.* 1989]. Posteriormente las proteínas se trasferieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Hybond-P, Amersham). La membrana se bloqueó una hora en buffer salino con 1% de tween 20 (TBST) con 0.4% del reactivo de BioRad. Posteriormente la membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal primario anti EGFP (1:1000, Clontech). Por último, la membrana se incubó con el anticuerpo de cabra anti-ratón unido a la peroxidasa de rábano (Amersham). La detección del complejo antígeno anticuerpo se realizó con el kit ECL Advance (Amersham). La detección de la señal se realizó por autorradiografía. Para más detalle consultar el apéndice A.

### **10.10. Análisis estadístico.**

El análisis de los datos se realizó con los paquetes pClamp8 (Axon) y Origin 7.5 (Origin lab. Corporation, USA). Las curvas de la corriente (I en  $\mu$ A) contra el voltaje (V en mV) muestran los valores promedio y la desviación estándar de los registros de un número (n) de experimentos individuales. El análisis de varianza (ANOVA) y la t-student se emplearon para comparar las diferencias significativas entre los experimentos con una  $p < 0.01$ .

## 11. Resultados y discusión.

Parte de estos resultados se publicaron en:

- Salvador, C., Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G., and Escobar, L.I. (2001) Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512, 135–47 (Apéndice B).
- Salvador, C., Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. y Escobar LI. (2003) Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences.* 72:1509–18 (Apéndice B).
- Mora, S.I. y Escobar, L.I. (2005) Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett.* 579:3019-23 (Apéndice B).

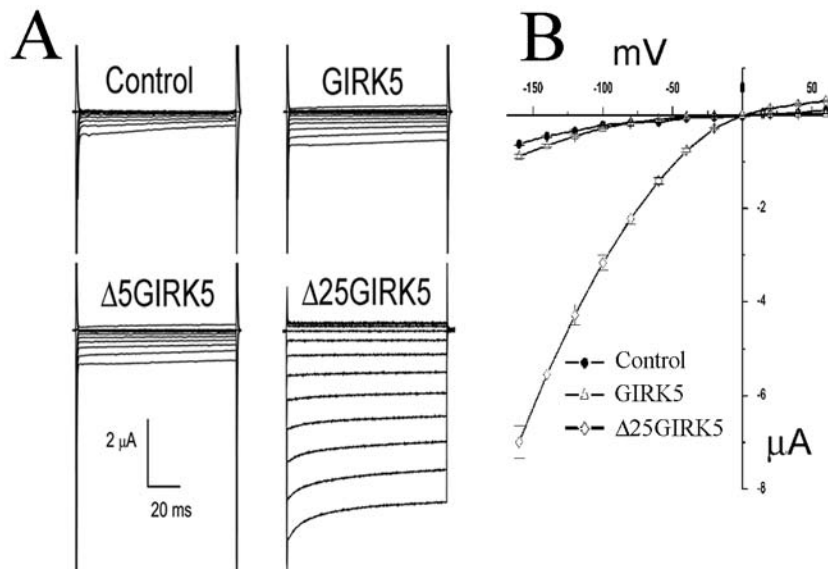
### 11.1. Expresión funcional de las isoformas del canal GIRK5.

La corriente basal de los canales GIRK5,  $\Delta 5$ GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus* se estudió mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Definiremos a la corriente basal como la corriente que se registra a voltajes hiperpolarizantes respecto al  $E_K$  en ausencia de un agonista. Al expresar a los canales homomultiméricos GIRK5,  $\Delta 5$ GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5 en los ovocitos, únicamente la isoforma más corta mostró corrientes entrantes de  $7.6 \mu A \pm 0.2 \mu A$  a  $-160$  mV ( $n= 12$ ) con una solución de registro alta en potasio (118 mM de  $K^+$ , Figura 1A y B).

El nivel de la corriente de los canales GIRK5 y  $\Delta 5$ GIRK5 no tiene diferencias significativas respecto a la corriente registrada en los ovocitos inyectados con 50 nl de  $H_2O$  (Figura 1A y B control), siendo éstas de  $1.4 \pm 0.15 \mu A$  ( $n=12$ ),  $1.7 \pm 0.15 \mu A$

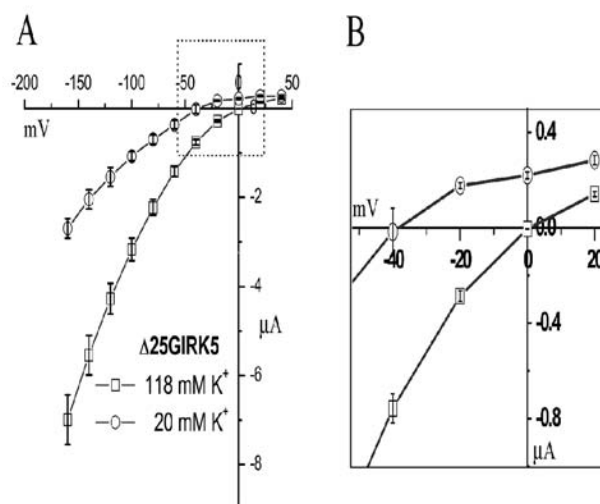
( $n=14$ ) y  $1.56 \pm 0.28 \mu\text{A}$  ( $n=10$ ), respectivamente ( $p>0.01$  Figura 1A ). La solución de registro utilizada en estos experimentos contiene 118 mM de  $\text{K}^+$ .



**Figura 1.** *Expresión de los canales GIRK5.* A) Registros de la corriente de los ovocitos inyectados con 10 ng de ARNc de los canales GIRK5, Δ5GIRK5 y Δ25GIRK5. B) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados ( $n=10<12$ ). La adquisición de los registros se realizó con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos con una solución de registro de 118 mM de  $\text{K}^+$ . Los registros se realizaron de 2 a 4 días después de la microinyección. Los ovocitos inyectados con 50 nl de  $\text{H}_2\text{O}$  se utilizaron como control.

En los canales Kir al aumentar la concentración de  $\text{K}^+$  externo el potencial de inversión de la corriente se desplaza a voltajes positivos en relación con el potencial de equilibrio para el ión potasio [Hagiwara y Yoshii 1979, Lu 2004]. En este estudio se encontró que el potencial de inversión de la corriente en los ovocitos que expresan a los canales Δ25GIRK5 registrados en condiciones simétricas de potasio (118 mM) fue de aproximadamente 0 mV (Figura 2A y B) y al utilizar una solución baja en  $\text{K}^+$  (20mM) fue de aproximadamente -40 mV (Figura

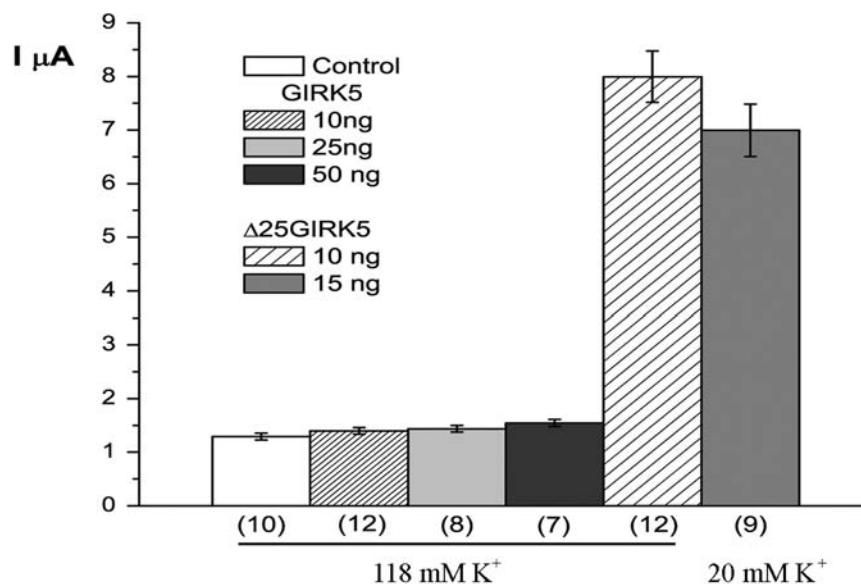
2B). Estos resultados concuerdan con los valores estimados para el potencial de equilibrio del ión  $K^+$ . Esto indica que la concentración de potasio externo afecta el  $E_K$  y el potencial de inversión de los canales  $\Delta 25GIRK5$  como en todos los canales  $K_{ir}$ .



**Figura 2.** Efecto de la concentración de  $K^+$  externo en el canal  $\Delta 25GIRK5$ . A) Curva I-V de los ovocitos inyectados con 10 ng de ARNc del canal  $\Delta 25GIRK5$ . Se utilizaron dos diferentes concentraciones de  $K^+$  en la solución externa 118 y 20 mM ( $n= 13$ ). En B se observa una ampliación del recuadro marcado en A.

Para comprobar si la cantidad de ARNc inyectado en los ovocitos tiene efecto en el nivel de expresión de los canales  $GIRK5$  se inyectaron concentraciones crecientes de ARNc. Al registrar a los ovocitos encontramos que la actividad de los canales  $GIRK5$  no varía aunque la cantidad del ARNc por ovocito aumentara hasta 50 ng (Figura 3). Por el contrario, al aumentar la cantidad de ARNc de los canales  $\Delta 25GIRK5$  las corrientes registradas sobrepasan los 10  $\mu A$  al superar los 15 ng por ovocito (Figura 3). Corrientes mayores a 10  $\mu A$  tienden a saturar el amplificador por lo cual se disminuyó la concentración de  $K^+$  en la solución externa (20 mM) para poder registrar confiablemente las corrientes en estos ovocitos (Figura 3).

Estos resultados nos sugieren que únicamente la isoforma más corta es funcional ( $\Delta 25$ GIRK5).

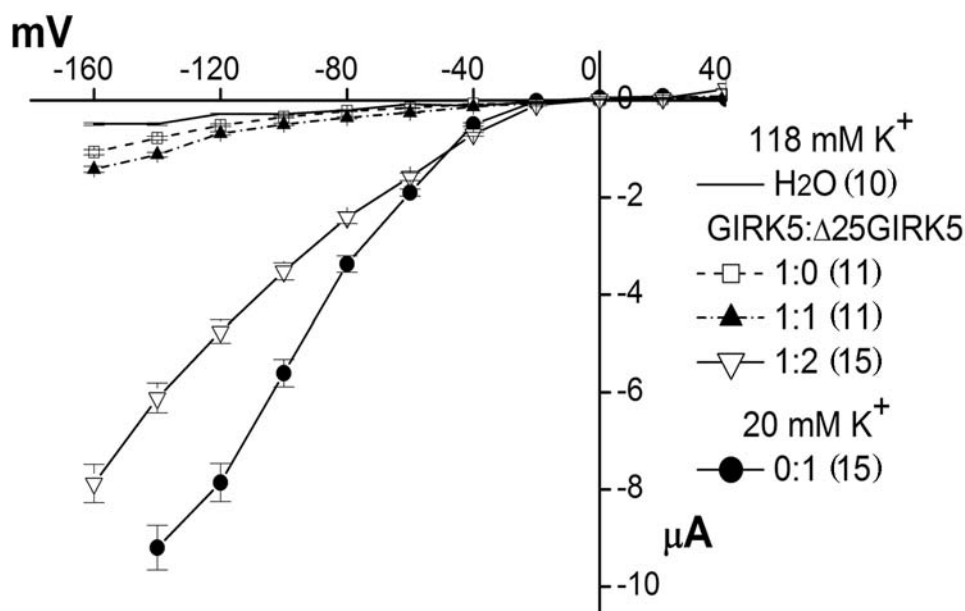


**Figura 3.** Efecto de la cantidad de ARNc de los canales GIRK5 en los ovocitos. Muestra el promedio de los registros obtenidos a -160 mV al inyectar cantidades diferentes de ARNc de los canales GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5. Se inyectaron 10, 25 y 50 ng de ARNc por ovocito del canal GIRK5 y del canal  $\Delta 25$ GIRK5 10 y 15 ng por ovocito. Los registros se realizaron en condiciones simétricas de potasio (118 mM) excepto para los ovocitos inyectados con 15 ng del ARNc del canal  $\Delta 25$ GIRK5 cuya concentración fue de 20 mM de K<sup>+</sup>. Los números entre paréntesis corresponden a los ovocitos registrados (*n*). Los ovocitos inyectados con 50 nl de H<sub>2</sub>O se utilizaron como control.

### 11.1.2. Coexpresión de los canales GIRK5 y $\Delta 25$ GIRK5.

Para comprobar si existe un efecto de la isoforma GIRK5 en la expresión del canal  $\Delta 25$ GIRK5, el ARNc de las isoformas GIRK5 y  $\Delta 25$ GIRK5 se coinyectó en diferentes cantidades y se registró la corriente basal. La corriente registrada en los ovocitos inyectados con el ARNc del canal GIRK5 o con la mezcla 1:1 de las

isoformas GIRK5: $\Delta$ 25GIRK5 no muestran diferencias significativas comparado con los ovocitos control inyectados con agua (Figura 4)



**Figura 4.** Efecto de la coexpresión de los canales *GIRK5* y  $\Delta$ 25*GIRK5*. Curva corriente contra voltaje de los ovocitos coinyectados con diferentes cantidades del ARNc de los canales *GIRK5* y  $\Delta$ 25*GIRK5*. La cantidad inicial inyectada fue de 15 ng de ARNc por ovocito. Los registros se realizaron de 2 a 4 días después de la inyección y con una solución externa de 118 mM de K<sup>+</sup>. Únicamente cuando se inyectó el ARNc del canal  $\Delta$ 25*GIRK5* la concentración de K<sup>+</sup> externo fue de 20 mM. Los ovocitos inyectados con agua se utilizaron como control. Entre paréntesis se muestra el número de ovocitos registrados (*n*).

Las corrientes registradas, a -160 mV y alto potasio (118 mM) fueron de  $0.979 \pm 0.05 \mu\text{A}$  ( $n=10$ ) para los ovocitos inyectados con agua, y en los inyectados con el ARNc de los canales *GIRK5*: $\Delta$ 25*GIRK5* fue de  $1.421 \pm 0.15 \mu\text{A}$  ( $n=11$ ) para la mezcla 1:0 (15 ng:0 ng) y  $1.56 \pm 0.28 \mu\text{A}$  ( $n=11$ ) para la mezcla 1:1 (15 ng: 15 ng,  $p>0.01$ , Figura 4). Para la mezcla 1:2 (*GIRK5*: $\Delta$ 25*GIRK5*, 15 ng:30 ng) se observa que la corriente aumenta de manera significativa a  $6.90 \pm 1.85 \mu\text{A}$  ( $n=15$ ,  $p< 0.01$ ). Esto probablemente se deba a que se estén formando homotetrámeros del canal  $\Delta$ 25*GIRK5* debido a que la concentración de ARNc para el canal  $\Delta$ 25*GIRK5*

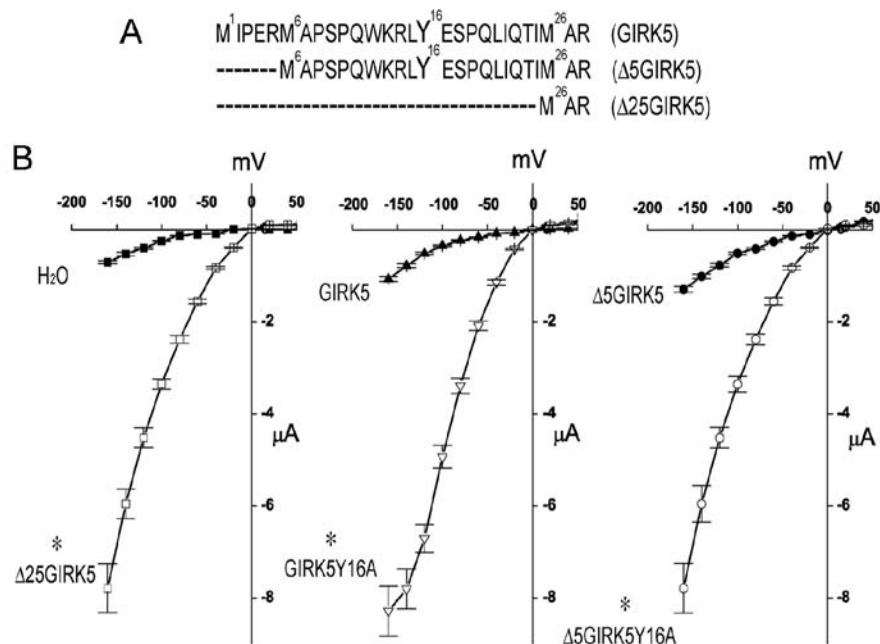
aumentó al doble respecto al GIRK5. Cuando se expresó únicamente el canal  $\Delta 25$ GIRK5 (15 ng de ARN por ovocito) se registraron corrientes mayores a 10  $\mu$ A a -160 mV y una solución de registro alta en potasio (118 mM), debido a que no se fija correctamente el voltaje a estas amplitudes de corriente se disminuyó la concentración de potasio en la solución de registro a 20 mM. La corriente basal registrada fue de  $6.60 \pm 1.45 \mu$ A ( $n=15$ , Figura 4). Estos resultados muestran que al inyectar cantidades equivalentes del ARNc de los canales GIRK5: $\Delta 25$ GIRK5 la isoforma GIRK5 impide la expresión funcional de la isoforma  $\Delta 25$ GIRK. Cuando se inyectan cantidades mayores de ARNc del canal funcional,  $\Delta 25$ GIRK5, la corriente que se registra probablemente se deba a la formación de homotetrámeros del canal  $\Delta 25$ GIRK5. Nuestros resultados sugieren que la isoforma GIRK5 inhibe la expresión funcional de la isoforma  $\Delta 25$ GIRK5.

### **11.2. Efecto de la fosforilación de la tirosina 16 (Y16) en la expresión funcional de los canales GIRK5.**

En los primeros aminoácidos de los canales GIRK5 y  $\Delta 5$ GIRK5 se encuentra un residuo de tirosina (Y16) dentro de una secuencia probable de fosforilación LYEXL (Figura 5A) [Schmitz et al. 1996]. Dado que la fosforilación en residuos de tirosinas puede modular a la gran familia de los canales de potasio, entre ellos a los de la subfamilia Kir [Moral et al. 2001, Lin et al. 2002, Wang et al. 2002, Sterling et al. 2002, Tong et al. 2001, Rogalski et al. 2000, Ippolito et al. 2002], es probable que la fosforilación de este residuo de tirosina (Y16) regule la expresión funcional de los canales GIRK5. Para comprobar si la fosforilación de la Y 16 tiene algún efecto en la actividad de los canales GIRK5 se optó por seguir dos estrategias que se describen a continuación.

### 11.2.1 Efecto de la mutación de la Y16 por alanina en los canales GIRK5.

Primeramente se mutó la Y16 por un aminoácido no fosforilable, la alanina (A). Los canales  $\Delta 25$ GIRK5, GIRK5 y sus mutantes (GIRK5Y16A y  $\Delta 5$ GIRK5Y16A) se expresaron en los ovocitos de la rana *Xenopus*. Al registrar la corriente basal se encontró que los canales mutantes expresan corrientes típicas rectificadoras entrantes, de magnitud comparable a la corriente producida por el canal  $\Delta 25$ GIRK5 (Figura 5B). La corriente basal registrada a  $-160$  mV fue de  $8.5 \pm 0.2$   $\mu$ A ( $n=11$ ) para GIRK5Y16A,  $8 \pm 0.35$   $\mu$ A ( $n=9$ ) para  $\Delta 5$ GIRK5Y16A y  $7.5 \pm 0.25$   $\mu$ A ( $n=12$ ) para  $\Delta 25$ GIRK5 (Figura 5B). No se encontraron diferencias significativas entre las corrientes de los canales mutantes y las del canal  $\Delta 25$ GIRK5 ( $p>0.01$ ). Dado que los canales mutantes (GIRK5Y16A y  $\Delta 5$ GIRK5Y16A) son funcionales, nuestros resultados sugieren que la Y16 inhibe la expresión funcional de los canales GIRK5.



**Figura 5.** *Expresión funcional de los canales mutantes.* A) Secuencia de los primeros aminoácidos de las isoformas del canal GIRK5. B) Curva corriente contra voltaje de los ovocitos inyectados con el ARNc (10 ng) de los canales GIRK5 silvestres y mutantes. Los trazos muestran el promedio de un número independiente de experimentos que varió de 9 a 12. Registros adquiridos con una solución externa de 118 mM de K<sup>+</sup>. \* muestra la diferencia significativa entre las muestras control respectivas ( $p<0.01$ ).



### 11.2.2. Efecto de dos inhibidores de las PTKs en la función de los canales GIRK5.

La fosforilación de residuos de tirosinas disminuye la corriente de los canales Kv 1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv 7.x, ROMK1, Kir2.1, GIRK1 y GIRK4 [Moral et al. 2001, Lin et al. 2002, Wang et al. 2002, Sterling et al. 2002, Tong et al. 2001, Rogalski et al. 2000, Ippolito et al. 2002], si la fosforilación de la Y16 en los canales GIRK5 evita su función probablemente al inhibir a las cinasas de tirosina endógenas de los ovocitos los canales GIRK5 sean funcionales. Para poder responder comprobar esta hipótesis los ovocitos control y los inyectados con el ARNc de los canales GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 se incubaron independientemente con los inhibidores de las PTKs, genisteína (20  $\mu$ M) o geldanamicina (75 nM). Después de una hora de incubación la corriente basal de los ovocitos inyectados con 50 nl de agua aumento 1.27 veces con genisteína y 1.75 veces con geldanamicina (Tabla 4, Figura 6). De igual manera, se registró un ligero incremento en la corriente basal registrada de los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 ( $p > 0.01$ , tabla 4, Figura 6). La corriente aumentó 1.23 veces con genisteína y 1.05 veces con geldanamicina en los ovocitos que expresan el canal mutante GIRK5Y16A (Tabla 4, Figura 6). Los ovocitos que expresan el canal  $\Delta$ 25GIRK5 aumentó 1.27 veces con genisteína y 1.37 veces con geldanamicina (Tabla 4, Figura 6).

**Tabla 4.** Efecto de dos inhibidores de PTKs sobre la corriente basal de los canales GIRK5.

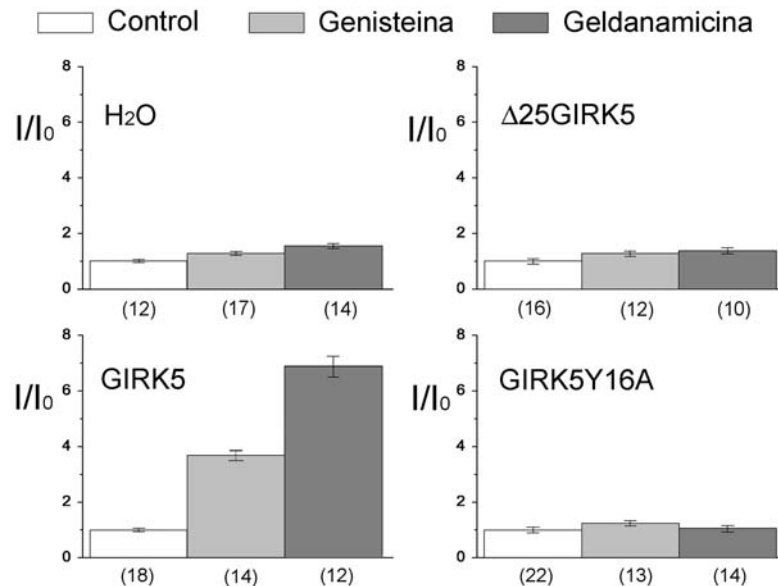
I en $\mu$ A (n)	sin inhibidor	genisteína	geldanamicina
H <sub>2</sub> O	0.53 $\pm$ 0.08 (12)	0.67 $\pm$ 0.10 (17)	1.0 $\pm$ 0.14 (14)
GIRK5	0.70 $\pm$ 0.10 (18)	2.58 $\pm$ 0.34 (14)*	4.83 $\pm$ 0.63 (12)*
GIRK5Y16A	4.92 $\pm$ 0.44 (22)	6.09 $\pm$ 0.55 (13)	5.16 $\pm$ 0.46 (14)
$\Delta$ 25GIRK5	5.10 $\pm$ 0.46 (16)	6.48 $\pm$ 0.58 (12)	7.01 $\pm$ 0.63 (10)

Los resultados muestran la corriente registrada a -160 mV y una solución de registro con 118 mM de K<sup>+</sup>. \*  $p < 0.01$

Sorpresivamente, la corriente basal de los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales GIRK5 incubados con los inhibidores de las cinasas de tirosina aumentó 3.7 veces con genisteína y 6.8 veces con geldanamicina (Tabla 4,  $p < 0.01$ ). Los canales GIRK5 podrían estar desfosforilados debido a que al inhibir a las cinasas de tirosina endógenas con genisteína o geldanamicina, la tasa de desfosforilación supera a la de fosforilación.

Los canales GIRK5 además de la Y16 poseen otros residuos de tirosinas en la región amino terminal (Y75, Y93, Y95) con probabilidad de fosforilarse. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que estos residuos de tirosinas no afectan la corriente de los canales GIRK5 dado que la corriente registrada en los ovocitos que expresan a los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 no aumentó significativamente al incubarse con los inhibidores de las cinasas de tirosina ( $p > 0.01$ , Figura 6). Estos resultados indican que la fosforilación de la tirosina 16 es determinante en la inhibición de la expresión funcional de los canales GIRK5. Sin embargo, el mecanismo por el cual la fosforilación de la Y16 inhibe la corriente de los canales GIRK5 no queda claro.

Es probable que la fosforilación de la Y16 modifique las propiedades biofísicas de los canales GIRK5, como la probabilidad de apertura o su conductancia, o que impida que los canales lleguen a la membrana plasmática [Fadool. *et al.* 1997, Tong *et al.* 2001, Moral *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Cook y Fadool 2002, Gamper *et al.* 2003]. En los siguientes experimentos comprobaremos si la fosforilación de la Y16 en los canales GIRK5 evita que los canales se anclen a la membrana plasmática.



**Figura 6.** Efecto de dos inhibidores de dos cinasas de tirosinas en los canales *GIRK5*. Corriente normalizada de los ovocitos inyectados con agua y con el ARNc de los canales *GIRK5* incubados una hora con genisteína (20  $\mu$ M) o geldanamicina (75 nM). La corriente registrada sin haber incubado a los ovocitos con algún inhibidor fue tomada como control ( $I_0$ ). Los números entre paréntesis muestran los ovocitos registrados.

### 11.2.3. La fosforilación de la Y16 en los canales *GIRK5* impide su expresión a nivel de la membrana.

#### 11.2.3.1. Expresión de las proteínas de fusión con la EGFP.

La fosforilación de residuos de tirosina de los canales de potasio rectificadores entrantes Kir 1.1 y Kir 2.1 puede modular su expresión funcional al disminuir la densidad de canales en la membrana a través de su endocitosis dependiente de dinamina [Tong *et al.* 2001, Moral *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002]. Es probable que la fosforilación de la Y16 en los canales *GIRK5* impida su función evitando que los

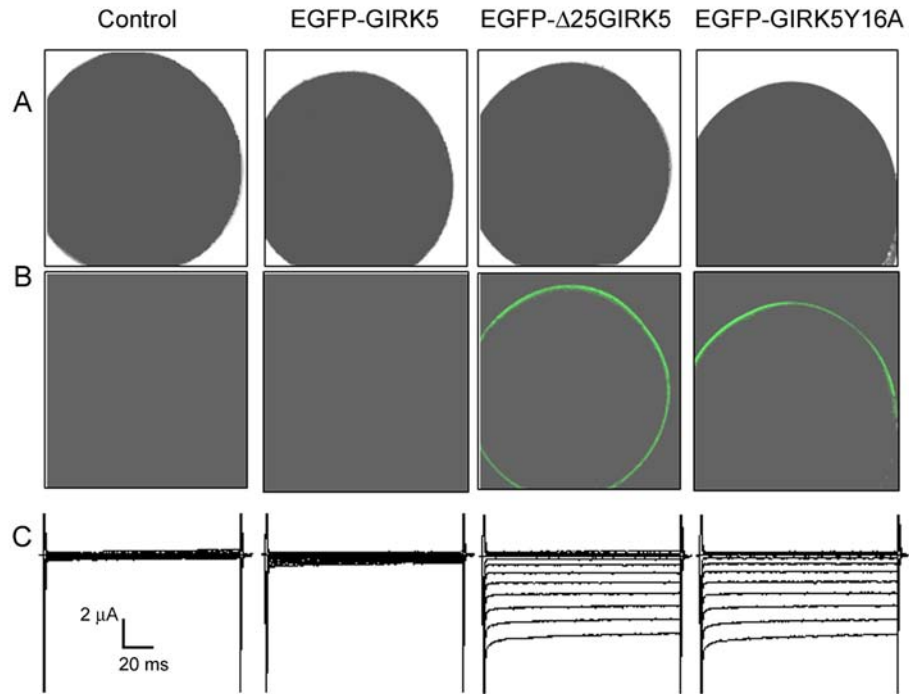
canales se anclan a la membrana celular. Para comprobarlo se construyeron las proteínas de fusión de los canales con la proteína verde fluorescente (EGFP).

Primeramente se evaluó el efecto de la EGFP en los canales GIRK5. El ARNc de los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 se inyectó en diferentes cantidades (5, 10, 15, y 25 ng por ovocito). Estos ensayos demostraron que únicamente al inyectar 25 ng de ARNc por ovocito de los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 se observa la corriente de potasio rectificadora entrante al cuarto día de la inyección (Figura 7C).

Los ovocitos de la rana *Xenopus* presentan autofluorescencia inducida con una longitud de onda de excitación de 480 nm al observarse con el microscopio confocal. Esta autofluorescencia insignificante se anuló ajustando el brillo, contraste y el iris del microscopio confocal (Figura 7 control). Estos parámetros se utilizaron para analizar la fluorescencia de los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5.

No se observó fluorescencia en los ovocitos inyectados con el ARNc de la proteína de fusión EGFP-GIRK5, mientras que los inyectados con EGFP-GIRK5Y16A o EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 presentaron fluorescencia a nivel de la membrana plasmática (Figura 7B). Este patrón fue mantenido en todo el plano óptico-z a través del ovocito, consistente con la distribución de los canales en la membrana plasmática.

Al registrar la corriente basal de los ovocitos control y los inyectados con el ARNc del canal EGFP-GIRK5 no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.01$ ): A -160 mV se registro una corriente entrante de  $0.45 \pm 0.05 \mu\text{A}$  ( $n=10$ ) en los ovocitos contro y  $0.68 \pm 0.05 \mu\text{A}$  ( $n=11$ ), en los EGFP-GIRK5 (Figura 7C). En contraste, en los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 se registraron corrientes entrantes de  $6.38 \pm 1.85 \mu\text{A}$  ( $n=11$ ) y  $5.22 \pm 1.05 \mu\text{A}$  ( $n=11$ ), respectivamente (Figura 7C).

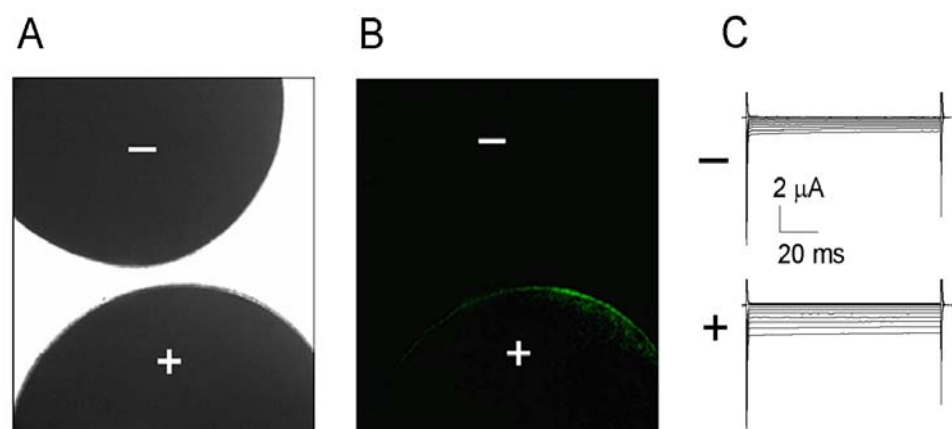


**Figura 7.** *Expresión de las proteínas de fusión con la EGFP.* Imágenes representativas de ovocitos inyectados con agua y con 25 ng de ARNc de las proteínas de fusión. A) Localización de los ovocitos dentro del campo óptico. Imágenes obtenidas en contraste de fases. B) Ovocitos observados con el microscopio confocal. C) Registros de la corriente de los ovocitos observados en A y B.

Nuestros resultados sugieren que la EGFP retarda la expresión de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 dado que los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 tardan más tiempo en expresar corrientes de más de 5  $\mu$ A (cuatro días) comparado con los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 (dos días). Además de que las proteínas de fusión requieren más ARNc (25 ng/ ovocito) que los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 (10ng/ ovocito). La construcción de las proteínas de fusión EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 no impidió que los canales funcionen.

Dado que en los ovocitos que presentan fluorescencia a nivel de la membrana celular se registran corrientes de potasio rectificadoras entrantes de más de 5  $\mu$ A (EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5, Figura 7), se sugiere que los canales GIRK5 no son funcionales por que no llegan a la membrana celular.

### 11.2.3.2. Efecto de la geldanamicina en la expresión funcional de los canales EGFP-GIRK5.



**Figura 8.** Efecto de la genisteína en la proteína de fusión EGFP-GIRK5. Imagen representativa de dos ovocitos inyectados con 25 ng del ARNc de la proteína de fusión EGFP-GIRK5. Uno de ellos fue incubado con (+) y sin (-) geldanamicina. A) Localización de los ovocitos dentro del campo óptico. Imagen obtenida en contraste de fases. B) Ovocitos observados con el microscopio confocal. C) Registro de la corriente de los ovocitos observados en A y B.

Para comprobar si la fosforilación de la Y16 impide que los canales GIRK5 lleguen a la membrana, los ovocitos que expresan a la proteína de fusión EGFP-GIRK5 se incubaron una hora con geldanamicina. En estas condiciones experimentales se observó fluorescencia en la membrana celular en los ovocitos

incubados con geldanamicina (Figura 8B). Además, en éstos ovocitos se registraron corrientes de  $2.8 \pm 0.4 \mu\text{A}$  a  $-160 \text{ mV}$  ( $n=7$ ; Figura 8).

Estos resultados muestran claramente que es la fosforilación de la Y16 la que modula la expresión funcional de los canales GIRK5.

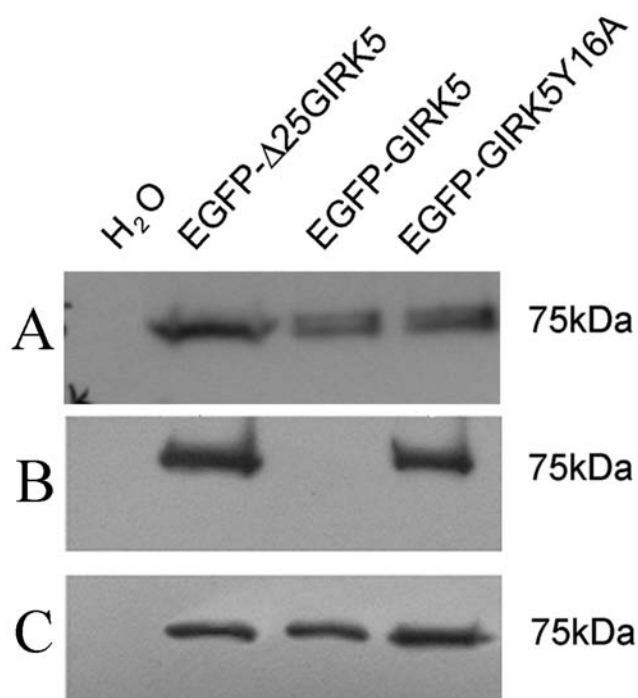
### **11.2.3.3. Inmunodetección de los canales en la membrana plasmática.**

Para demostrar que la fluorescencia observada en los ovocitos EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 se debe a que la desfosforilación de los canales promueve su expresión en la membrana plasmática se obtuvo la fracción de la membrana plasmática (fracción de alta densidad) y la fracción de las vesículas intracelulares (fracción de baja densidad) de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O y con el ARNc de los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5. Las proteínas de las fracciones se separaron por electroforesis, se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti EGFP de ratón (técnica de Western Blot, ver métodos).

En el Western Blot correspondiente a la la fracción de baja densidad que contiene las vesículas microsomales se identificó una banda de aproximadamente 75 kDa en las líneas correspondientes a los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5, mientras que en la correspondiente a la de los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O no (Figura 9A). La traducción in vitro del canal GIRK5 da como resultado una proteína de 45 kDa [Hedin et al. 1996] y el análisis de Western Blot de la proteína EGFP muestra una banda de aproximadamente 30 kDa (Valor especificado por Clontech). Esto indica que la banda observada de 75 kDa corresponde efectivamente a la expresión de los canales EGFP-GIRK5, GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 en la fracción microsomal.

Por otra parte al analizar la fracción de alta densidad, correspondiente a la membrana celular, se observa la banda de 75 kDa en las líneas correspondientes a los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 (Figura 9B). No se detectó señal

en la fracción correspondiente a los ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O ni con el ARNc del canal EGFP-GIRK5 (Figura 9B). Estos resultados indican que los canales EGFP-GIRK5 no se localizan en la membrana plasmática, mientras que los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP-Δ25GIRK5 si.



**Figura 9.** *Inmunodetección de las proteínas de fusión en la fracción membranal.* Western Blott de la fracción membranal de 10 ovocitos inyectados agua (H<sub>2</sub>O) o con el ARNc de los canales EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A y EGFP-Δ25GIRK5 incubados (+) y sin incubar (-) con geldanamicina (75 nM). La banda de 75 kDa se identificó con el anticuerpo primario anti EGFP de ratón.

Para probar si la fosforilación de la Y16 está implicada en la expresión de los canales GIRK5 en la membrana plasmática los ovocitos se incubaron una hora con geldanamicina (75 nM), un inhibidor de las cinasas de tirosinas. Posteriormente se realizó la extracción de la fracción de la membrana plasmática. Sorpresivamente, al



analizar esta fracción se se observó la banda de 75 kDa correspondiente a los ovocitos EGFP-GIRK5 (Figura 9C). No se observó cambio aparente en las bandas correspondientes a los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 (Figura 9). Estos resultados indican que la fosforilación de la Y16 impide que los canales GIRK5 se anclen a la membrana celular.

El grupo de Chavkin encontró que la fosforilación de dos residuos de tirosinas localizados en la región amino terminal de los canales mutantes homoméricos GIRK1F137S y GIRK4S143T inhibe su corriente [Rogalski et al. 2000]. Observaron que al activar a la tirosina cinasa TrkB la fosforilación de los residuos de tirosina Y12 y Y67 en el GIRK1, y Y32 y Y53 en el GIRK4 pone al descubierto un dominio GAP, una glutamina (Q28 y Q51 en GIRK4) y una arginina (R30 y R52 en GIRK4) colocados antes del residuo de tirosina (Y), presente en estos canales (Figura 10A). Esto provoca el incremento de la actividad GTPasa de la subunidad  $G\alpha$ , la disminución de las proteínas  $G\beta\gamma$  libres y por consecuencia, la inhibición de la corriente de los canales GIRK [Ippolito et al. 2002]. El análisis del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los canales GIRK muestra que el canal GIRK5 presenta la región del amino terminal más larga entre los integrantes de la subfamilia GIRK (Figura 10B). Entre los primeros 25 aminoácidos se encuentra la tirosina 16. Junto a este aminoácido se encuentra un residuo de arginina (R14) y un glutamato (Q12, Figura 10B) que, según el grupo de Chavkin, forman el dominio GAP. [Ippolito et al. 2002]. Sin embargo, los canales GIRK2 y GIRK5 tienen un aspartato (D) en lugar de la primera tirosina correspondiente al sitio 1 predicho (Figura 10), mientras que en el sitio 2 si se presenta la segunda tirosina (Y58 en GIRK2 y Y75 en GIRK5, Figura 9). Si la tirosina Y75 presente el canal GIRK5 activa al sitio GAP, la corriente de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 aumentaría significativamente cuando los ovocitos fueron incubados con los inhibidores de las cinasas de tirosinas, sin embargo no se observó un aumento en la corriente de estos canales (Figura 6). Estos resultados sugieren que la Y16 es la más importante en la

expresión funcional de los canales GIRK5 (Figura 10). La tirosina 16. también se encuentra acotado por un domino GAP (Figura 10B) [Ippolito et al. 2002] sin embargo nuestros resultados sugieren que la disminución de la corriente en estos canales, al fosforilarse la Y16, no se debe a que baja la disponibilidad de proteínas G $\beta\gamma$  libres, sino a que los canales GIRK5 no llegan a la membrana(Figuras 6).

	Sitio 1	Sitio 2
<b>A</b>	GIRK1 ALRRKFGDD <u>Y</u> QVV (3-15)	GSETSR <u>Y</u> LSDLF (61-72)
	GIRK2 PKLPKQARD <u>D</u> LPR (23-35)	KRKIQ <u>R</u> YVRKDG (52-68)
	GIRK4 KKI PKQARD <u>Y</u> IPI (32-44)	KKPRQ <u>R</u> YMEKTG (47-58)
	GIRK5 KKLPKQARE <u>D</u> PKH (45-63)	KKPRQ <u>R</u> YMEKDG (69-80)
<b>B</b>	GIRK1 -----MSALRRKFGDDYQVVTTSSSGSGL (1-24)	
	GIRK2 -----MTMAKLTESMTNVLEGDSMD (1-21)	
	GIRK4 -----MAGDSRNAMN (1-10)	
	GIRK5 MIPERMAPSPQWKRL <u>Y</u> ESPLIQTIMARDLRVSMN (1-37)	

**Figura 10.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos en la región amino terminal de los canales GIRK. A) Se muestran los sitios 1 y 2 de fosforilación en residuos de tirosinas. B) Alineamiento de la secuencia de los primeros aminoácidos. Note que el canal GIRK5 presenta el extremo amino más largo. Los residuos subrayados corresponden a los aminoácidos que presuntamente comprenden el dominio GAP [A modificada de Ippolito *et al.* 2002].

Nuestros resultados confirman que la fosforilación de la Y16 en los canales GIRK5 modula su expresión impidiendo que los canales lleguen a la membrana celular (Figuras 6-9). De igual manera la fosforilación de la Y337 en los canales Kir 1.1 y la Y242 en los canales Kir 2.1 provoca la disminución de la corriente registrada debido a un decremento de la densidad de los canales en la membrana provocado por la endocitosis de los canales dependiente de dinamina [Wang et al. 2002, Tong et al. 2001]. La diferencia de este tipo de modulación es que la

fosforilación en los canales Kir 1.1 y Kir 2.1 se da en la región carboxilo terminal y la del canal GIRK5 en la amino terminal.

Los resultados de este estudio indican que la fosforilación de la Y16 impide que los canales GIRK5 lleguen a la membrana plasmática. Sin embargo, no se descarta que la fosforilación de la Y16 pueda modificar algunas propiedades biofísicas de los canales como la probabilidad la apertura o su conductancia unitaria como sucede en otro tipo de canales de potasio [Holmes *et al.* 1996b, Fadool. *et al.* 1997, Cook y Fadool 2002, Gamper *et al.* 2003]. Para descartar esta hipótesis es necesario realizar ensayos como los de canal unitario.

### **11.3. Propiedades de los canales GIRK5.**

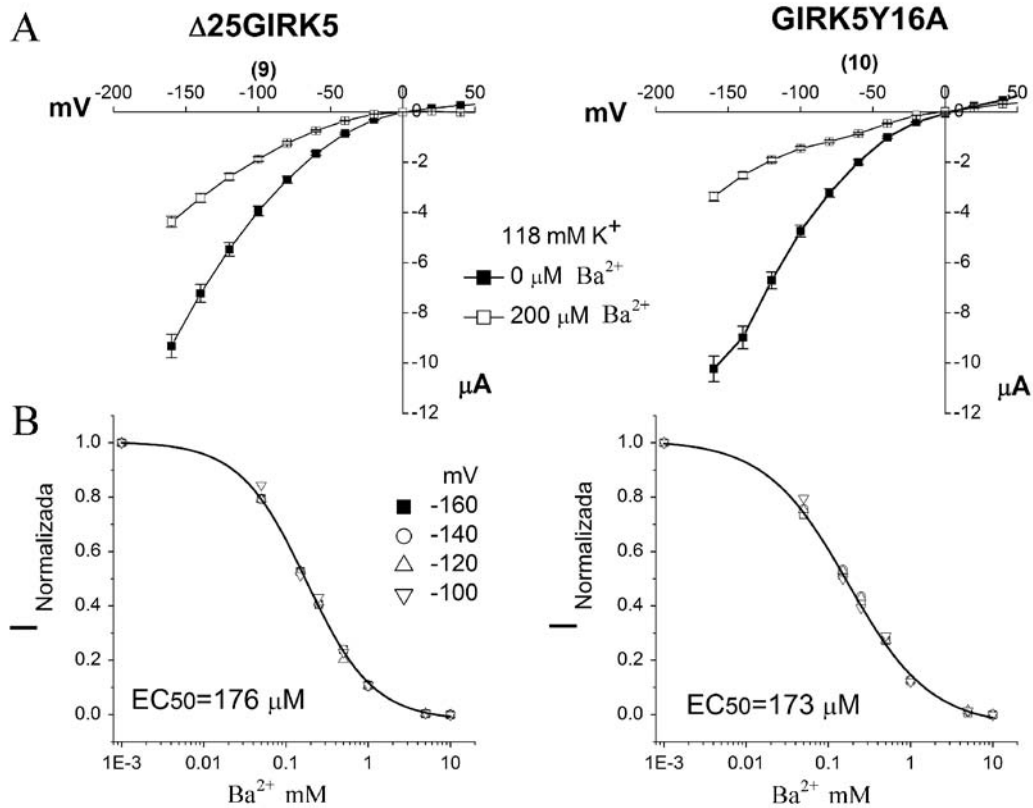
Los canales GIRK presentan propiedades farmacológicas y cinéticas que los distinguen de las otras subfamilias Kir. La sensibilidad al bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo, la activación por proteínas G y la formación de heterotetrámeros funcionales con el canal GIRK1 son algunos aspectos que se analizarán a continuación.

#### **11.3.1. Bloqueo de la corriente en los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5 por Ba<sup>2+</sup> externo.**

Una propiedad farmacológica de los canales Kir es el bloqueo de la corriente por Ba<sup>2+</sup> externo (Tabla 2). La aplicación de Ba<sup>2+</sup> extracelular en los canales Kir provoca un bloqueo de la corriente debido a la obstrucción del poro por el Ba<sup>2+</sup>. En un trabajo previo comprobamos que el canal Δ25GIRK5 es más sensible al bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo que el heterotetrámero GIRK1/GIRK4 [Salvador *et al.* 2001]. La EC<sub>50</sub> fue de 150 μM en el rango de voltaje muestreado (-160 a -80 mV) lo que indicó que el bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo es independiente del voltaje [Salvador *et al.* 2001]. Para comprobar si existe alguna diferencia en la afinidad al bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo entre la isoforma más larga y la corta, se determinó la EC<sub>50</sub> del bloqueo por Ba<sup>2+</sup> externo en los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5. Al aumentar gradualmente la

concentración de  $Ba^{2+}$  externo en la solución de registro ( $Ba^{2+}$  en mM: 0, 0.05, 0.15, 0.25, 0.5, 1, 5, y 10), la corriente de estos canales disminuye en proporción a la cantidad del  $Ba^{2+}$  agregado. La corriente de los canales se bloquea más del 50% con 200  $\mu M$  de  $Ba^{2+}$  en la solución de registro (Figura 11A). En este estudio determinamos que la  $EC_{50}$  para el canal GIRK5Y16A es de 173  $\mu M$  ( $n=10$ ) y de 176  $\mu M$  ( $n=9$ ) para el canal  $\Delta 25$ GIRK5 (Figura 11B). Estos valores no se modificaron en el rango de voltaje muestreado lo que indica que el bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo no depende del voltaje (de -160 a -80 mV, Figura 11B). Estos resultados concuerdan con los reportados previamente para la isoforma  $\Delta 25$ GIRK5 donde se demostró que el bloqueo por  $Ba^{2+}$  no es dependiente del voltaje [Salvador *et al.* 2001].

En la mayoría de los canales Kir el bloqueo de la corriente por  $Ba^{2+}$  depende del voltaje [Hagiwara *et al.* 1976, Kubo *et al.* 1993, Shieh *et al.* 1998]. Es decir, la afinidad de los canales por el  $Ba^{2+}$  es mayor a voltajes más negativos, esto implica que los iones  $Ba^{2+}$  entran al poro de los canales [Sakmann y Trube 1984, Lopez-Barneo *et al.* 1993, Zang *et al.* 1995]. Por ejemplo, para el canal Kir 2.1 la  $EC_{50}$  es de 0.2  $\mu M$  a -160 mV y 2.2  $\mu M$  a -80 mV [Shieh, *et al.* 1998]. La corriente del heterotetrámero GIRK1/GIRK4 también se bloquea por  $Ba^{2+}$  externo de manera dependiente de voltaje mostrando una  $EC_{50}$  de 0.5 mM a -80 mV y 120 mM a 0 mV [Zang *et al.* 1995, Krapivinsky *et al.* 1995]. La  $EC_{50}$  para el canal mutante no presentó diferencias significativas respecto al canal  $\Delta 25$ GIRK5 en el intervalo de voltaje muestreado (de -160 a -80 mV,  $p < 0.01$ ). En el laboratorio se demostró que los residuos N129 y K157 localizados en el vestíbulo del poro del canal GIRK5 participan en la afinidad al bloqueo por  $Ba^{2+}$  [Salvador *et al.* 2001]. Nuestros resultados obtenidos sugieren que los primeros 25 aminoácidos de la región amino terminal no participan en la sensibilidad al bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo en los canales GIRK5.



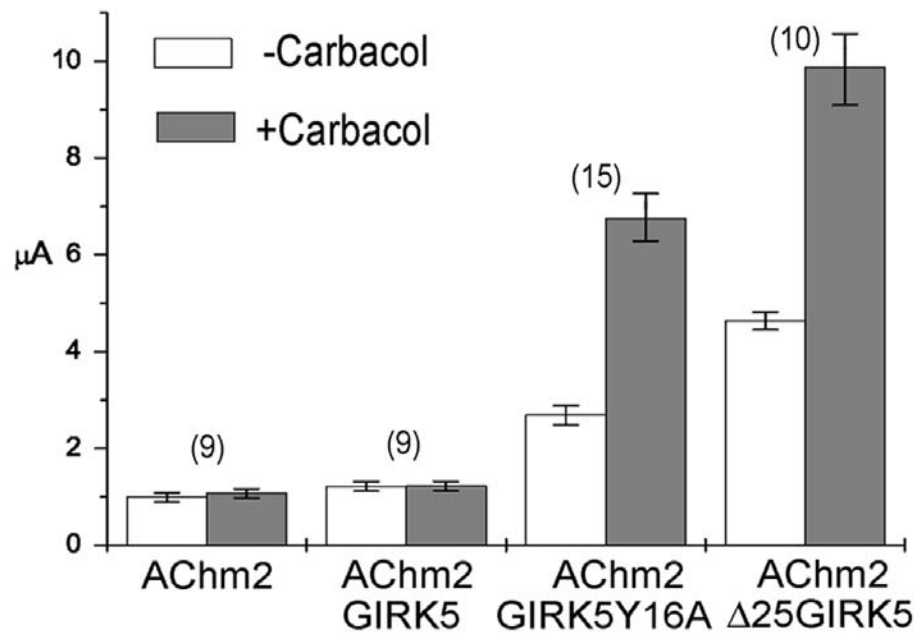
**Figura 11.** Bloqueo de la corriente de los canales GIRK5 por Ba<sup>2+</sup> externo. A) Curvas corriente contra voltaje de los registros obtenidos con 0 y 200 μM de Ba<sup>2+</sup> en la solución de registro. B) Curva dosis-respuesta de la corriente normalizada. En esta grafica se observa que la EC<sub>50</sub> de 176 μM para los canales Δ25GIRK5 y de 173 μM para GIRK5Y16A. No se presentaron diferencias entre las EC<sub>50</sub> en un rango el rango muestreado de -160 mV a -80 mV. No se encontraron diferencias significativas entre la EC<sub>50</sub> de los canales (p>0.01). Los números entre paréntesis muestra el numero de ovocitos registrados.

### 11.3.2. Activación de los canales GIRK5 a través del receptor AChm<sub>2</sub>.

La activación de diversos receptores membranales acoplados a las proteínas G sensibles a la toxina pertussis, producen cambios conformacionales en la subunidad Gα que permiten el intercambio de GDP por GTP, lo cual induce la

liberación de la subunidad  $G\beta\gamma$  y la activación de los canales GIRK (Esquemas 16-18) [Neer 1995, Yamada *et al.* 1998, Mark y Herlitz 2000, Sadja *et al.* 2003, Wettschureck y Offermanns 2005]. Los canales GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 se coexpresaron con el receptor AChm<sub>2</sub> para observar la actividad de los canales mediada por el receptor muscarínico.

Los ovocitos inyectados únicamente con el ARNc del receptor AChm<sub>2</sub> se utilizaron como control. Al activar al receptor muscarínico AChm<sub>2</sub> con carbacol no se observó un incremento significativo de la corriente, respecto a la registrada en los ovocitos control y en los coinyectados con el ARNc del canal GIRK5 y el receptor AChm<sub>2</sub> ( $p > 0.01$ , Figura 12). En contraste, la corriente basal registrada en los ovocitos coinyectados con el ARNc del receptor AChm<sub>2</sub> y el de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 aumentó significativamente al activar a los receptores ( $p < 0.01$ , Figura 12). La corriente obtenida a -160 mV aumento de  $2.68 \pm 0.20 \mu\text{A}$  a  $6.74 \pm 0.68 \mu\text{A}$  ( $n=15$ ) para el canal GIRK5Y16A y de  $2.9 \pm 0.20 \mu\text{A}$  a  $6.17 \pm 0.4 \mu\text{A}$  ( $n=10$ ) para el canal  $\Delta$ 25GIRK5 (Figura 12). En este caso para poder registrar a los canales funcionales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 acoplados al receptor AChm<sub>2</sub> y se inyectó 5 ng de RNAc por ovocito para no saturar el amplificador. Se observó que la corriente basal de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 (10 ng por ovocito) disminuye cuando los canales se coexpresan con el receptor muscarínico (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la actividad basal registrada en los ovocitos inyectados con el RNAc de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 se debe a las proteínas  $G\beta\gamma$  libres y que al coexpresar al receptor muscarínico la corriente disminuye probablemente debido a que el receptor muscarínico (AChm<sub>2</sub>) secuestre al trímero  $G\alpha\beta\gamma$  (ver mas adelante).



**Figura 12.** Activación de la corriente de los canales GIRK5 mediada por el receptor AChm<sub>2</sub>. Corriente entrante registrada a -160 mV de los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales GIRK5 y el del receptor AChm<sub>2</sub>. Esta se registro en ausencia (-carbacol) y presencia (+carbacol) de carbacol a una concentración de 10 µM. Los números entre paréntesis muestra los ovocitos registrados.

El mecanismo de regulación de los canales de potasio GIRK a través del receptor muscarínico es un proceso delimitado a la membrana [Logothetis *et al.* 1987, Reuveny *et al.* 1994, Soejima y Noma 1984, Dascal 2001]. Esto concuerda con lo observado anteriormente en donde los canales GIRK5 no se activan al estimular el receptor AChm<sub>2</sub> debido a que no se encuentran en la membrana. Además, estos resultados nos indican que los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5, al igual que los canales formados por los heterotetrámeros GIRK1/GIRK2, GIRK1/GIRK3 y GIRK1/GIRK4, conservan la propiedad de activarse a través de la activación de los receptores AChm<sub>2</sub>.

<b>Tabla 5:</b> Efecto de la coexpresión del receptor $AChm_2$ en la corriente basal de los homotetrámeros de GIRK5.		
AChm <sub>2</sub>	I en $\mu A$	
	-	+
GIRK5Y16A	8.5 $\pm$ 0.2 (n=11)	4.5 $\pm$ 0.30 (n=6)
$\Delta$ 25GIRK5	7.5 $\pm$ 0.25 (n=12)	4.2 $\pm$ 0.39 (n=5)
Corriente basal de los ovocitos inyectados con 10 ng de los canales coexpresados con (+) y sin (-) el receptor muscarínico		

### 11.3.3. Estudio de los heterotetrámeros del canal GIRK5 con el canal GIRK1.

Los canales de potasio rectificadores entrantes de la familia GIRK (Kir 3.x) forman heteromultímeros funcionales generalmente compuestos de la subunidad GIRK1 con cualquier otro miembro de esta subfamilia (GIRK2-4) [Karschin *et al.* 1997, Ponce *et al.* 1996, Kennedy *et al.* 1999, Jelacic *et al.* 1999 y 2000]. Nuestros resultados sugieren que los canales GIRK5 forman homomultímeros funcionales cuando la Y16 no está fosforilada. Sin embargo los canales GIRK5 forman heterotetrámeros funcionales con el canal GIRK1 ¿habrá alguna diferencia en la expresión funcional de los heterotetrámeros de GIRK1 con mutantes y silvestres? Previamente observamos que al coexpresar a los canales GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 con el receptor muscarínico AChm<sub>2</sub> la corriente basal disminuye, comparada con la registrada sin el receptor. ¿Habrán diferencias en la corriente de los heterotetrámeros al coexpresarlos con y sin el receptor AChm<sub>2</sub>? Para responder a estas preguntas se coexpresaron los canales GIRK4, GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 con el canal GIRK1. El heterotetrámero GIRK1/GIRK4 se utilizó como control positivo. Los ovocitos inyectados sólo con el canal GIRK1 se utilizaron



como control del acoplamiento del canal GIRK1 con el canal GIRK endógeno de los ovocitos. En los tetrámeros se estudió la corriente basal y la mediada a través de la activación del receptor AChm<sub>2</sub>. Los resultados de estos estudios se describirán a continuación:

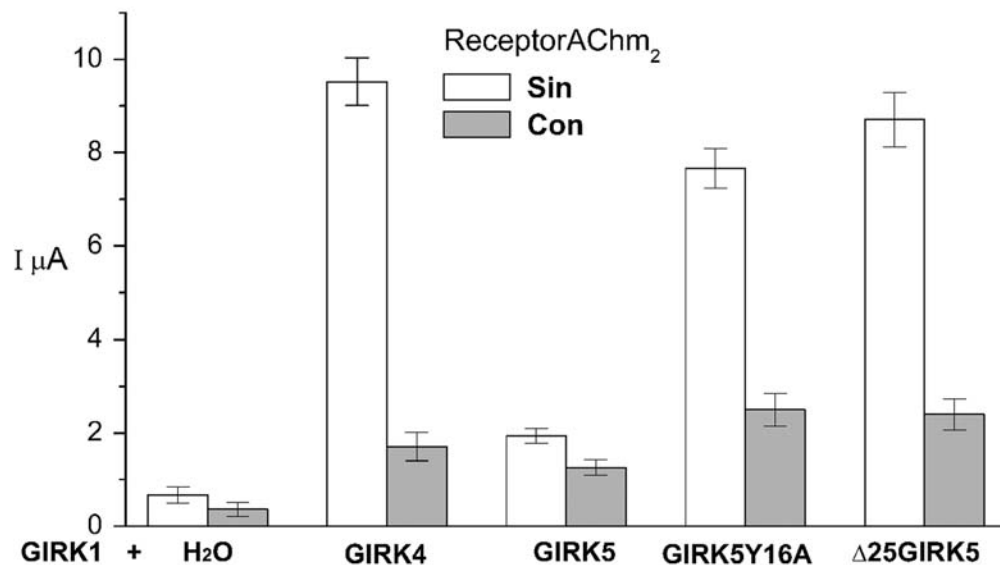
#### **11.3.3.1. Comparación de la actividad basal en los heterotetrámeros.**

Se estudió la corriente basal de los heterotetrámeros con y sin el acoplamiento del receptor AChm<sub>2</sub>. Debido a que la corriente registrada a -160 mV para los los heterotetrámeros GIRK1/GIRK4, GIRK1/GIRK5Y16A y GIRK1/ $\Delta$ 25GIRK5, sin coexpresar al receptor muscarínico AChm<sub>2</sub> fue mayor a 10  $\mu$ A y la fijación de voltaje no es la adecuada se utilizó la corriente registrada a -80 mV. La corriente entrante de los heterotetrámeros sin el receptor AChm<sub>2</sub> fue de  $9.52 \pm 0.60 \mu\text{A}$  ( $n=7$ ) para GIRK1/GIRK4,  $7.66 \pm 0.84 \mu\text{A}$  ( $n=5$ ) para GIRK1/GIRK5Y16A y  $8.70 \pm 0.95 \mu\text{A}$  para GIRK1/ $\Delta$ 25GIRK5 ( $n=6$ ),  $1.94 \pm 0.25 \mu\text{A}$  ( $n=8$ ) para GIRK1/GIRK5 (Figura 13).

Cuando los tetrámeros se expresaron con el receptor muscarínico la corriente registrada a -160 mV no rebasó los 10  $\mu$ A. Sin embargo para fines comparativos se tomó el valor de la corriente registrada a -80 mV. La corriente registrada fue de  $1.26 \pm 0.12 \mu\text{A}$  para GIRK1/GIRK5 ( $n=6$ ),  $1.91 \pm 0.31 \mu\text{A}$  para GIRK1/GIRK4 ( $n=8$ ),  $2.65 \pm 0.63 \mu\text{A}$  para GIRK1/GIRK5Y16A ( $n=7$ ) y  $2.4 \pm 0.42 \mu\text{A}$  para GIRK1/ $\Delta$ 25GIRK5 ( $n=6$ , Figura 13).

Nuestros resultados muestran que la corriente basal de todos los heterotetrámeros disminuye al coexpresarlos con el receptor AChm<sub>2</sub>. Este efecto se observa cuando los canales homotetráméricos GIRK5Y16A y  $\Delta$ 25GIRK5 se coexpresan con el receptor AChm<sub>2</sub> (Figura 12). En el estado basal los receptores membranales y las proteínas G forman un complejo pentamérico que involucra la asociación física entre dos subunidades del receptor y el trímero G $\alpha\beta\gamma$  [Baneres y Parello 2003, Nobles *et al.* 2005]. Es probable que al coexpresar al receptor

muscarínico se reclute al trímero  $G\alpha\beta\gamma$  de los ovocitos y en el estado basal se forme el pentámero. Las proteínas  $G\beta\gamma$  libres disminuyen y por consiguiente la corriente basal de los canales GIRK. De esta manera el receptor muscarínico podría funcionar como una proteína que secuestra a las proteínas  $G\beta\gamma$  libres al formar el complejo pentamérico receptor- $G\alpha\beta\gamma$  [Baneres y Parello 2003, Nobles *et al.* 2005]. Sin embargo es necesario realizar más experimentos para probar esta hipótesis.



**Figura 13.** Efecto de la coexpresión del receptor  $AChm_2$  en la actividad basal de los heterotetrámeros. Se registró la actividad basal de los heterotetrámeros del canal GIRK1 con los canales GIRK4, GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 sin (barras blancas) y con la coexpresión del receptor  $AChm_2$  (barras grises). Las barras muestran los promedios de la corriente entrante registrada a  $-80$  mV. La solución de registro con  $118$  mM de  $K^+$ . Como control negativo se expresó el canal GIRK1 en los ovocitos de la rana *Xenopus* (GIRK1+H<sub>2</sub>O). El tetramero GIRK1/GIRK4 se utilizó como control positivo.

### 11.3.3.2. Comparación de la actividad de los heterotetrámeros mediada por el receptor AChm<sub>2</sub>.

En el experimento anterior se comparó la actividad basal de los heterotetrámeros del canal GIRK1 con los canales GIRK5, GIRK5Y16A y Δ25GIRK5 con y sin el acoplamiento del receptor AChm<sub>2</sub>, sin embargo para obtener la actividad mediada por el receptor se obtuvo la corriente basal y la registrada al activar a los receptores con 10 μM de carbacol. Dado que la corriente basal registrada en los heterotetrámeros acoplados con el receptor AChm<sub>2</sub> no superan los 10 μA a -160 mV, se utilizaron las corrientes obtenidas a este voltaje para comparar las corrientes. Para todos los heterotetrámeros la corriente basal aumentó aproximadamente dos veces al activar al receptor con 10 μM de carbacol (Figura 14). En la tabla 6 se muestra la corriente promedio de los tetrámeros antes y después de la activación del receptor AChm<sub>2</sub>.

*Tabla 6. Comparación de la actividad de los heterotetrámeros coexpresados con el receptor AChm<sub>2</sub>.*

GIRK1+ AChm <sub>2</sub> +	I en μA	
	Basal	10 μM Carbacol
H <sub>2</sub> O (7)	0.68 ± 0.09	1.36 ± 0.16
GIRK4 (7)	3.41 ± 0.31	7.4 ± 0.67
GIRK5 (6)	2.6 ± 0.12	7.09 ± 0.64
GIRK5Y16A (8)	4.95 ± 0.63	10.5 ± 1.2
Δ25GIRK5 (6)	4.64 ± 0.42	10.22 ± 0.92

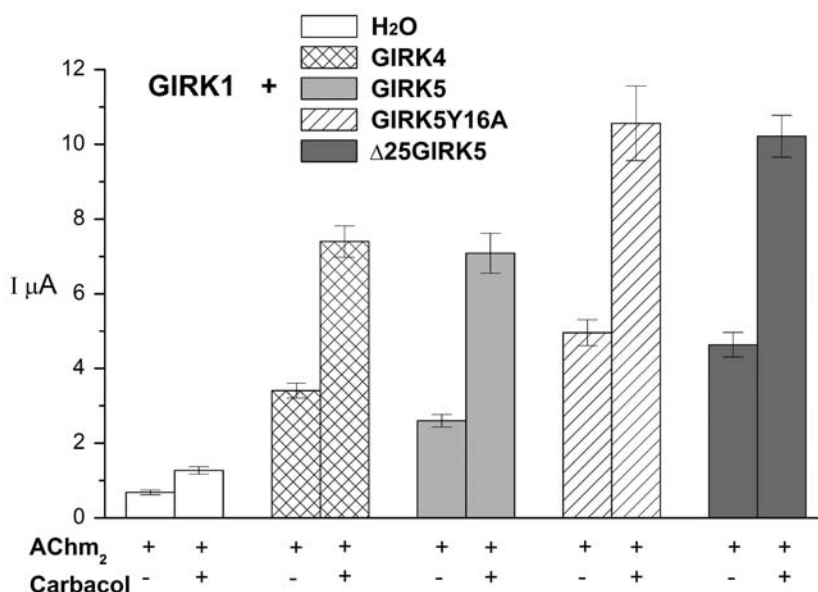
Se muestran los valores promedio de un número (n) independiente de experimentos. Registros a -160 mV y una solución alta en potasio (118 mM).

La corriente registrada del heterotetrámero GIRK1/GIRK5Y16A, a través de la activación del receptor, es de mayor amplitud que la del tetrámero GIRK1/GIRK5 (Figura 13 y 14). Llama la atención que el homotetrámero de GIRK5 no llega a la membrana como homomultímero mientras que los heterotetrámeros si (GIRK1/GIRK5).

Se sabe que la expresión en la membrana celular de los canales GIRK1/GIRK2 y GIRK1/GIRK4 es mayor que la del tetrámero GIRK1/GIRK3 [Ma *et al.* 2002]. Al igual que en los canales GIRK1/GIRK3, en general, el heterotetrámero GIRK1/GIRK5 es el que presenta las corrientes de menor amplitud comparado con los heterotetrámeros GIRK1/GIRK4, GIRK1/GIRK5Y16A y GIRK1/ $\Delta$ 25GIRK5, posiblemente se deba a que existan menos canales GIRK1/GIRK5 en la membrana.

Existen secuencias de señalización que determinan el tráfico de los canales hacia la membrana. El canal GIRK2A y GIRK4 poseen señales que les permiten la exportación del retículo endoplasmático [Kenedy *et al.* 1999]. En el canal GIRK4 al eliminar los aminoácidos del 350 al 419, localizados en la región carboxilo terminal, se impide la expresión de de los canales GIRK1/GIRK4 y de los homómeros de GIRK4 en la membrana celular [Kenedy *et al.* 1999]. La región que comprende los aminoácidos del 375 al 399 es crucial para la localización del heterotetrámero GIRK1/GIRK4 en la membrana celular [Kenedy *et al.* 1999]. Para el canal GIRK2, son los aminoácidos del 1 al 44 en la región amino terminal y del 396 al 403 en la carboxilo terminal, los importantes para su exportación del retículo endoplasmático y posterior tráfico hacia la membrana celular [Ma *et al.* 2002]. En el canal GIRK3 los aminoácidos tirosina, triptofano, serina e isoleusina (YWSI) en la región carboxilo terminal forman una secuencia que potencialmente es una señal de retención lisosomal YXX $\Phi$  (donde X es cualquier aminoácido y  $\Phi$  (aminoácido hidrofóbico voluminoso) [Ma *et al.* 2002]. Esta secuencia potencialmente es la que inhibe la expresión de los tetrámeros GIRK1/GIRK3 en la membrana celular [Ma *et al.* 2002]. Al igual que el canal GIRK3, la Y16 en el canal GIRK5 podría formar parte

de la secuencia YXXΦ (YESP), si bien, la prolina no es un aminoácido no polar voluminoso es posible que la Y16 se encuentre formando parte de un dominio de retención que involucre la fosforilación de la Y16 como señal de retención y al estar fosforilada disminuya la densidad de los canales heterotetrámeros y homotetrámeros en la membrana. Sin embargo, es necesario llevar a cabo los experimentos que permitan comprobarlo.



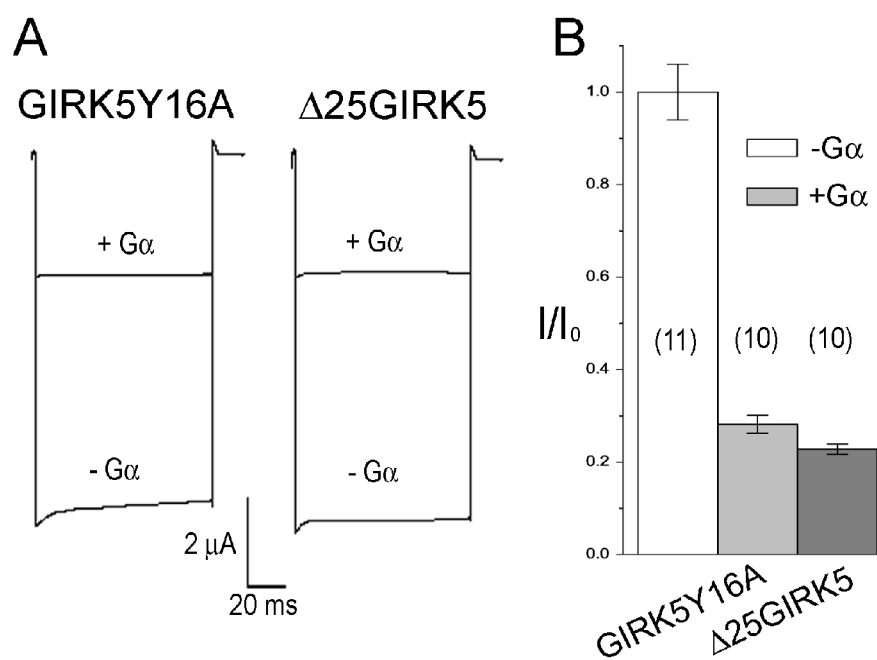
**Figura 14.** Comparación de la corriente mediada a través de la activación del receptor AChm<sub>2</sub> en los heterotetrámeros. Expresión funcional de los heterotetrámeros con GIRK1 y los canales GIRK4, GIRK5, GIRK5Y16A y Δ25GIRK5 coexpresados con el receptor AChm<sub>2</sub>. Corriente basal (-) y corriente registrada al activar al receptor muscarínico con 10 μM de carbacol (+) Corriente obtenida a -160 mV de un numero variable de experimentos (n=5<8).

La corriente basal y la evocada a través de la activación del receptor AChm<sub>2</sub> cuando sólo se expresó el canal GIRK1 muestra que el canal GIRK1 forma heterotetrámeros con el canal endógeno GIRK5 de los ovocitos (Tabla 5, Figura 13 y 14, GIRK1+H<sub>2</sub>O).

#### **11.4. Las proteínas endógenas Gβγ libres activan a los canales GIRK5.**

En los resultados anteriores se observa que los ovocitos que únicamente expresan a los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5 muestran una gran actividad basal respecto de los canales mutantes y de la isoforma más corta. ¿A que se debe que los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5, muestren corrientes basales mayores a 7 μA?. Se ha mencionado que la actividad basal de los canales GIRK puede ser el resultado de la unión de las proteínas Gβγ libres a los canales [He *et al.* 2002, Sadjja *et al.* 2003]. Para comprobar si esta actividad basal se debe a la poza endógena de proteínas Gβγ libres en los ovocitos de la rana *Xenopus*, se expresaron los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5 con y sin la proteína Gα<sub>i2</sub>. Al coexpresar los canales con la Gα<sub>i2</sub> se observa que la corriente entrante disminuyó de 10.25 ± 0.95 μA (n=8) a 3.89 ± 0.35 μA (n=10) para el canal GIRK5Y16A y de 11.12 ± 1.21 μA (n=12) a 3.79 ± 0.25 μA (n=10) para el canal Δ25GIRK5 (Figura 15). Esta inhibición de la corriente para ambos canales es de aproximadamente el 70 %. Es probable que al sobreexpresar a la proteína Gα<sub>i2</sub> se produzca una disminución de la subunidad Gβγ libre en los ovocitos y, por lo tanto, se observa un decremento significativo en la corriente de los canales (Figura 15, p>0.01). Se ha identificado que las proteínas Gβγ libres intervienen en mantener a los ovocitos arrestados en la fase G2 del ciclo celular [Romo *et al.* 2002, Sheng *et al.* 2001 y 2005]. La expresión de los canales se realizó en los ovocitos de los estadios V y VI arrestados en la fase del ciclo celular G2. Nuestros resultados sugieren que las proteínas Gβγ libres, que mantienen a los ovocitos en la fase G2, activan a los canales GIRK5Y16A y Δ25GIRK5. Esto explicaría la gran actividad basal registrada de los canales GIRK5Y16A y

$\Delta 25$ GIRK5 en los ovocitos, mientras que en otros sistemas de expresión, como en las células de insecto, la corriente basal es nula [Salvador et al. 2003]. Nuestros resultados sugieren que la corriente basal registrada en los ovocitos inyectados con el ARNc de los canales homoméricos GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5, y tentativamente la de los heterotetrámeros GIRK1/GIRKx, se debe a la poza endógena de proteínas  $G\beta\gamma$  libres en los ovocitos.



**Figura 15.** Efecto de la coexpresión de la proteína  $G\alpha_{i2}$  en la corriente de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5. A) Muestra los trazos de la corriente obtenida a -160 mV cuando se expresan los canales solos (-G $\alpha$ ) o con las proteínas  $G\alpha_{i2}$  (+G $\alpha$ ). B) Corriente normalizada obtenida a -160 mV donde se muestra claramente la inhibición de la corriente al coexpresar los canales con las proteínas  $G\alpha_{i2}$ . Entre paréntesis se muestra el número de ovocitos registrados.

### 11.5. Los canales GIRK5 en los ovocitos.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V y VI, que son ampliamente utilizados como el sistema de expresión heteróloga, se mantienen en la fase G2 de la meiosis I. Se ha observado que el incremento de los niveles de AMPc juega un papel importante en mantener a los ovocitos arrestados en esta fase del ciclo celular [Guzman *et al.* 2005]. La continuación de la meiosis, también llamada maduración, se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) observada como una mancha blanca en el polo animal en los ovocitos.

La progesterona producida por las células foliculares induce la maduración de los ovocitos a través de un mecanismo que provoca la inhibición de la adenilato ciclasa y reduce los niveles de AMPc [Sheng *et al.* 2001]. Sin embargo, la inhibición de la adenilato ciclasa no involucra a la cascada de señalización de las proteínas G sensibles a la toxina pertussis,  $G\alpha_i/G\alpha_0$  [Sadler *et al.* 1984]. Sin embargo, se ha observado mediante la utilización de proteínas que reclutan a los dímeros libres  $G\beta\gamma$  (scavengers), que la disminución de las proteínas  $G\beta\gamma$  provoca la maduración espontánea de los ovocitos [Sheng *et al.* 2001]. Además la sobre expresión del dímero  $G\beta_1\gamma_2$ , inhibe la maduración de los ovocitos inducida por progesterona [Sheng *et al.* 2001]. Nuestros resultados sugieren que las proteínas  $G\beta\gamma$  libres que mantienen a los ovocitos en la fase G2 activan a los canales GIRK5Y16A,  $\Delta 25$ GIRK5 y a los heterotetrámeros de los canales GIRK4, GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 formados con el canal GIRK1. Por esa razón al coexpresar a los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 con la proteína  $G\alpha_{i2}$ , la corriente basal disminuyó (Figura 15), debido que la  $G\alpha_{i2}$  secuestró a las proteínas  $G\beta\gamma$  libres que mantienen arrestados a los ovocitos en la meiosis I. Asimismo, se observó un decremento en la corriente cuando los homomultímeros (GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5) y los heterotetrámeros (GIRK1/GIRK4, GIRK1/GIRK5, GIRK1/GIRK5Y16A y GIRK1/ $\Delta 25$ GIRK5) se coexpresaron con el receptor muscarínico m2. Esto sugiere que los receptores inactivos al requerir del acoplamiento del trímero  $G\alpha_{GTP}\beta\gamma$



produce la disminución del dímero  $G\beta\gamma$  libres y, por lo tanto, la inhibición de la corriente basal de los canales GIRK (Figuras 14 y 15).

La fosforilación de la Y16 puede ser una señal para mantener bajos los niveles de expresión del canal GIRK5 en los ovocitos. Se ha observado que la fosfolipasa  $\beta$  y la tirosina cinasa de Bruton pueden ser estimuladas por la familia de la subunidad  $G\alpha_q$  [Bence *et al.* 1997]. Además de activar o inhibir la cascada de señalización de la adenilato ciclasa, las proteínas  $G\alpha_{i/o}$  o  $G\alpha_s$ , estimulan la actividad de la tirosina cinasa Hck, una cinasa de la familia de la Src [Ma *et al.* 2000]. El mecanismo por el cual las proteínas G activan a las cinasas de tirosinas no es claro, pero no involucra la vía de señalización del AMPc [Ma *et al.* 2000].

Se ha observado que los niveles de expresión de la subunidad  $G\alpha_s$  también regulan la maduración de los ovocitos de la rana *Xenopus* [Romo *et al.* 2002]. La expresión de la subunidad endógena  $G\alpha_s$  así como de las subunidades  $G\beta\gamma$ , ayudan a mantener el arresto de los ovocitos en la fase G2 del ciclo celular [Romo *et al.* 2002, Sheng *et al.* 2001 y 2005]. Por otra parte, las proteínas cinasa de tirosina xSrc endógena de los ovocitos está implicada en su maduración [Tokmakov *et al.* 2005]. Esto indica que existe un mecanismo complejo en la regulación del arresto y maduración de los ovocitos. Al parecer la subunidad  $G\alpha_s$  regula la actividad de la xSrc y, de esta manera, la fosforilación del canal GIRK5. Esto implica que las cascadas de señalización intracelular de los ovocitos regulan la expresión funcional de los canales GIRK5 a nivel de la membrana celular.

Se ha observado que la inhibición de los canales de potasio en diferentes tipos de células como en los linfocitos T, células de Schwann y células de melanomas, entre otros, inhiben la progresión del ciclo celular [Wonderlin y Strobl 1996]. Los inhibidores de los canales de potasio como el TEA, el verapamil y la glibenclamida inhiben la proliferación del ciclo celular [Wonderlin y Strobl 1996]. Los canales GIRK5 se expresan endogénamente en los ovocitos y sus corrientes generalmente son menores de 1  $\mu$ A. Esto sugiere que el canal GIRK5 además de regular el

potencial de membrana ayude a mantener a los ovocitos arrestados en la fase G2 del ciclo celular. Sin embargo es necesario llevar a cabo los experimentos que permitan comprobarlo.

## 12. Conclusiones.

Los resultados de este trabajo muestran la primera evidencia de que la fosforilación de un residuo de tirosina (Y16) localizado en la región amino terminal de los canales GIRK5 modula su tráfico hacia la membrana plasmática, y en consecuencia es responsable de modular su expresión en la membrana celular.

Las conclusiones particulares son:

- Únicamente la isoforma más corta es funcional ( $\Delta 25$ GIRK5) como homotetrámero.
- La isoforma GIRK5 ejerce un efecto dominante negativo en la expresión funcional de la isoforma  $\Delta 25$ GIRK.
- La mutación de un sólo residuo de tirosina (16) en el canal GIRK5 promueve su expresión funcional.
- Los inhibidores de tirosinas cinasas promueven el tráfico a la membrana plasmática de los canales GIRK5.
- La fosforilación de la tirosina 16 inhibe la expresión funcional de los canales GIRK5.
- La EGFP no afecta la función de los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5, únicamente retarda su expresión.
- La fosforilación de los canales GIRK5 en la Y16 inhibe el tráfico de los homomultímeros a la membrana celular.
- El bloqueo por  $Ba^{2+}$  en los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 no es dependiente del voltaje.

- Los primeros 25 aminoácidos no afectan la afinidad al bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo en los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5.
- Los canales GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 aumentan su corriente basal a través de la activación de los receptores AChm<sub>2</sub>.
- Los canales GIRK5, GIRK5Y16A y  $\Delta 25$ GIRK5 forman heterotetrámeros funcionales con el canal GIRK1.
- Los tetrámeros GIRK1/GIRK4, GIRK1/GIRK5Y16A y GIRK1/ $\Delta 25$ GIRK5 se expresan con mayor eficiencia que el heterotetrámero GIRK1/GIRK5.
- La corriente basal de los canales GIRK se debe a la poza endógena de proteínas G $\beta\gamma$  libres en los ovocitos.

### 13. Perspectivas.

Para poder determinar el papel fisiológico del canal GIRK5 en los ovocitos se necesita hacer ensayos en los cuales se registre la corriente de potasio rectificadora entrante en los estadios de maduración de los ovocitos. Debido a que los ovocitos al entrar en la fase de maduración no pueden ser registrados ya que presentan mucha corriente de fuga se propone hacer el anticuerpo contra un epítotope del canal GIRK5 para identificar a los canales en las diferentes fases del ciclo celular y determinar si su expresión se incrementa o disminuye.

La fosforilación de los canales GIRK5 en la tirosina 16 impide que los canales lleguen a la membrana celular. De estos resultados surgen varias preguntas:

1. ¿Cual es la cinasa de tirosina endógena que fosforila a los canales GIRK5 en los ovocitos? Se ha identificado que los ovocitos expresan una tirosina cinasa del tipo del sarcoma de Rous, a la que se denomina x-Src [Tokmakov *et al.* 2005]. Los ensayos con el inhibidor de las cinasas de tirosina (geldanamicina), sugieren que la tirosina x-Src endógena de los ovocitos es la que regula la actividad de los canales GIRK5. Para comprobar lo anterior se sugiere hacer ensayos específicos de interacción proteica como los de coimmunoprecipitación. Se sugiere utilizar al canal EGFP-GIRK5 y el anticuerpos contra la EGFP. También amplificar y mutar el gene dela x-Src (x-SrcR121H) para poderla detectar\_con el anticuerpo anti Src (mAb327). No se descarta la posibilidad de obtener los anticuerpos específicos contra el canal GIRK5 y la x-Src.

2. ¿La tirosina (Y16) forma parte de un motivo de retención intracelular? Se ha observado que ciertos motivos de retención celular involucran motivos que contienen en su secuencia residuos de tirosina. Se ha observado que el motivo  $Yxx\Phi$  (x es cualquier aminoácido,  $\Phi$  es algún aminoácido hidrofóbico voluminoso) es una secuencia de retención lisosomal y favorece la endocitosis de proteínas mediada por clatrina [Stockklausner *et al.* 2001, Ma *et al.*, 2002, Stockklausner y Klöcker 2003]. Los dominios de dileucina también favorecen la endocitosis de proteínas [Stockklausner y Klöcker 2003]. El dominio de dileucina DEXXXLI favorece el transporte retrogrado de proteínas que involucra al complejo adaptador de proteínas 2 (AP-2) [Kinlough *et al.* 2004]. Dos cargas negativas seguidas de tres aminoácidos cualquiera (X) y una leucina seguida de isoleucina formarían el motivo de dileucina. La Y16 en el canal GIRK5 (YESPQLI) comprendería un motivo de dileucina o formar parte del dominio de retención  $Yxx\Phi$ . Aunque la prolina no es un aminoácido hidrofóbico voluminoso es interesante comprobar si la Y16 forma parte de un dominio de endocitosis o retención intracelular.
  
3. ¿En que compartimento intracelular se encuentran los canales GIRK5 fosforilados? La función de los canales y de diversas proteínas de la membrana plasmática depende de manera crítica de la densidad en la superficie celular. Además de conocer si la Y16 forma parte de algún dominio de retención intracelular es importante saber si la fosforilación de la Y16 promueve la retención de los canales en el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi o se encuentra en el citoplasma formando endosomas.

## 14. Literatura citada.

- Aggarwal, S.K. y MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 16:1169-77.
- Aguilar-Bryan, L. y Bryan, J. (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr. Rev.* 20:101-35.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Rajan, A.S., Parker, C. y Bryan, J. (1992) Co-expression of sulfonylurea receptor and KATP channels in Hamster insulinoma tumor (HIT) cells. Evidence for direct association of the receptor with the channel. *J. Biol. Chem.* 267:14934-40.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P., Boyd, A.E., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J. y Nelson, D.A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 268:423-5.
- Aidley, D.J. y Stanfield, P.R. (1998) *Ion channels molecules in action*, Cambridge University Press, U K.
- Ashcroft, F.M. (2000) *Ion Channels and Disease*, San Diego Academic Press.
- Babenko, A.P., Aguilar-Bryan, L. y Bryan, J. (1998) A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60:667-87.
- Baneres, J.L. y Parello, J. (2003) Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J. Mol. Biol.* 329:815-29.
- Barish, M.E. (1983) A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 342:309-25.
- Bauer, C.K., Falk, T. y Schwarz, J.R. (1996) An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflugers Arch.* 432:812-20.
- Bence, K., Ma, W., Kozasa, T. y Huang, X.Y. (1997) Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by G(q)-protein alpha-subunit. *Nature*. 389:296-9.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; y Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. New York, W. H. Freeman and Co.
- Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80:555-92.
- Bianchi, L., Roy, M.L., Tagliatela, M., Lundgren, D.W., Brown, A.M. y Ficker, E. (1996) Regulation by spermine of native inward rectifier K<sup>+</sup> channels in RBL-1 cells. *J. Biol. Chem.* 271:6114-21.

- Bichet, D., Haass, F.A. y Jan, L.Y. (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:957-67
- Biggin, P.C., Roosild, T. y Choe, S. (2000) Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol.* 10:456-61.
- Boim, M.A., Ho, K., Shuck, M.E., Bienkowski, M.J., Block, J.H., Slightom, J.L, Yang, Y., Brenner, B.M. y Hebert, S.C. (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. Cloning and distribution of alternative forms. *Am. J. Physiol.* 268:F1132-40.
- Bolsover, S.R., Hyams, J.S., Shephard E.A., White, H.A. y Wiedemann, C.G. (2004) *Cell Biology: A Short Course*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Bond, C.T., Pessia, M., Xia, X.M., Lagrutta, A., Kavanaugh, M.P. y Adelman, J.P. (1994) Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels.* 2:183-91.
- Bowlby, M.R., Fadool, D.A., Holmes, T.C. y Levitan, I.B. (1997) Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J. Gen. Physiol.* 110:601-10.
- Casamassima, M., D'Adamo, M.C., Pessia, M. y Tucker, S J.(2003) Identification of a heteromeric interaction that influences the rectification, gating, and pH sensitivity of Kir4.1/Kir5.1 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 278:43533-40.
- Chan, K.W., Sui, J.L., Vivaudou, M. y Logothetis, D.E. (1996) Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14193-8.
- Clement, J.P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. y Bryan, J. (1997) Association and stoichiometry of K ATP channel subunits. *Neuron.* 18:827-38.
- Cook, K.K. y Fadool, D.A. (2002) Two adaptor proteins differentially modulate the phosphorylation and biophysics of Kv1.3 ion channel by SRC kinase. *J. Biol. Chem.* 277:13268-80.
- Corey, S. y Clapham, D.E. (1998) Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK4) channel homomultimers. *J. Biol. Chem.* 273:27499-504.
- Dascal, N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *Crit. Rev. Biochem.* 22:317-87.
- Dascal, N. (1997) Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Cell. Signal.* 9:551-73.



- Dascal, N. (2001) Ion channel regulation by G proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 12:391-8.
- Davis, M.J., Wu, X., Nurkiewicz, T.R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M.A. y Wilson, E. (2001) Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281:H1835-62.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. y Farquhar, M.G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:235-71.
- Derst, C., Konrad, M., Kockerling, A., Karolyi, L., Deschenes, G., Daut, J., Karschin, A. y Seyberth, H.W. (1997) Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K<sup>+</sup> channel function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:641-5.
- Doupnik, C.A., Davidson, N. y Lester H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:268-77.
- Doupnik, C.A., Davidson, N., Lester, H.A. y Kofuji, P. (1997) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of G-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10461-6.
- Doyle, D.A., Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. y MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.
- Erlich, H.A. (1992) PCR technology. WH Freeman and Co. N.Y.
- Fadool, D.A., Holmes, T.C., Berman, K., Dagan, D. y Levitan, I.B. (1997) Tyrosine phosphorylation modulates current amplitude and kinetics of a neuronal voltage-gated potassium channel. *J. Neurophysiol.* 78:1563-73.
- Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Zenner, H.P. y Ruppertsberg, J.P. (1994) Kir2.1 inward rectifier K<sup>+</sup> channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron.* 13:1413-20
- Fantl, W.J., Johnson, D.E. y Williams, L.T. (1993) Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62:453-81.
- Flagg, T.P., Tate, M., Merot, J. y Welling, P.A. (1999) A mutation linked with Bartter's syndrome locks Kir 1.1a (ROMK1) channels in a closed state. *J. Gen. Physiol.* 114:685-700.
- Gamper, N., Stockand, J.D. y Shapiro, M.S. (2003) Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J. Neurosci.* 23:84-95.
- Giannini, A. y Bijlmakers, M.J. (2004) Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination. *Mol Cell Biol.* 24:5667-76.

- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E., Covarrubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M.L., Grissmer, S., Jan, L.Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H.A., McKinnon, D., Nichols, C.G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M.M., Vandenberg, C.A., Wei, A., Wulff, H. y Wymore, R.S. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 55:583-6.
- Guzman, L., Romo, X., Grandy, R., Soto, X., Montecino, M., Hinrichs, M. y Olate, J. (2005) A Gbetagamma stimulated adenylyl cyclase is involved in *Xenopus laevis* oocyte maturation. *J. Cell. Physiol.* 202:223-9.
- Hagiwara, S. y Yoshii, M. (1979) Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. *J. Physiol.* 292:251-65.
- Hagiwara, S., Miyazaki, S. y Rosenthal, N.P. (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.* 67:621-38.
- Hagiwara, S., y Takahashi, K. (1974) The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J. Membr. Biol.* 18:61-80
- Hattan, D., Nesti, E., Cachero, T.G. y Morielli, A.D. (2002) Tyrosine phosphorylation of Kv1.2 modulates its interaction with the actin-binding protein cortactin. *J. Biol. Chem.* 277:38596-606.
- He, C., Yan, X., Zhang, H., Mirshahi, T., Jin, T., Huang, A. y Logothetis, D.E. (2002) Identification of critical residues controlling G protein-gated inwardly rectifying K(+) channel activity through interactions with the beta gamma subunits of G proteins. *J. Biol. Chem.* 277:6088-96.
- He, C., Zhang, H., Mirshahi, T. y Logothetis, D.E. (1999) Identification of a potassium channel site that interacts with G protein  $\beta\gamma$  subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* 274:12517-24.
- Hedin, K.E., Lim, N.F., y Clapham, D.E. (1996) Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of I<sub>K</sub>ACh currents in oocytes. *Neuron.* 16:423-29.
- Heginbotham, L. y MacKinnon, R. (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science.* 258:1152-5.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. y MacKinnon R. (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66:1061-67.

- Henry, P., Pearson, W.L. y Nichols, C.G. (1996) Protein kinase C inhibition of cloned inward rectifier (HRK1/KIR2.3) K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 495:681-8.
- Hill, J.J. y Peralta, E.G. (2001) Inhibition of a Gi-activated potassium channel (GIRK1/4) by the Gq-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 276:5505-10.
- Hille, B. (2001) *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, Mass., USA.
- Ho, I.H. y Murrell-Lagnado, R.D. (1999a) Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 274:8639-48.
- Ho, I.H. y Murrell-Lagnado, R.D. (1999b) Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Physiol.* 520:645-51.
- Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M. V. y Hebert, S.C. (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362:31-8.
- Holmes, T.C., Fadool, D.A., Levitan, I.B. (1996a) Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J. Neurosci.* 16:1581-90.
- Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R., Levitan, I.B. (1996b) Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science.* 274:2089-91.
- Horie, M., Irisawa, H. y Noma, H. (1987) Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* 387:251-72.
- Hoshi, N., Zhang, J.S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., Langeberg, L.K., Yoneda, Y., Scott, J.D., Brown, D.A. y Higashida H. (2003) AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neurosci.* 6:564-71.
- Huang, C.L., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1997) Binding of the G protein subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett.* 405:291-8.
- Huang, C.L., Feng, S. y Hilgemann, D.W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by Gβγ. *Nature.* 391:803-6.

- Huang, C.L., Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, N.Y. y Jan, L.Y. (1995) Evidence that direct binding of G to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation. *Neuron*. 15:1133-43.
- Huang, X.Y., Morielli, A.D. y Peralta, E.G. (1993) Tyrosine kinase-dependent suppression of a potassium channel by the G protein-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *Cell*. 75:1145-56.
- Hunter, T. y Cooper, J.A. (1985) Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 54:897-930.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. y Bryan, J. (1995) Reconstitution of I K ATP: an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science*. 270:1166-70.
- Inagaki, N., Gono, T., y Seino, S. (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett*. 409:232-36.
- Inanobe, A., Morishige, K.I., Takahashi, N., Ito, H., Yamada, M., Takumi, T., Nishina, H., Takahashi, K., Kanaho, Y., Katada, T. y Kurachi, Y. (1995) Gβγ directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic K<sup>+</sup> channel, GIRK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:1022-8.
- Inanobe, A., Horio, Y., Fujita, A., Tanemoto, M., Hibino, H., Inageda, K. y Kurachi Y. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J. Physiol.* 521:19-30.
- Ippolito, D.L., Temkin, P.A., Rogalski, S.L. y Chavkin, C. (2002) N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *J. Biol. Chem.* 277:32692-6.
- Ismailov, I.I. y Benos, D.J. (1995) Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int.* 48:1167-79.
- Ivanina, T., Rishal, I., Varon, D., Mullner, C., Frohnwieser-Steinecke, B., Schreibmayer, W., Dessauer, C.W. y Dascal, N. (2003) Mapping the Gβγ-binding sites in GIRK1 and GIRK2 subunits of the G protein-activated K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 278:29174-83.
- Jan, L.Y. y Jan, Y.N. (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:91-123.
- Jelacic, T.M., Kennedy, M.E., Wickman, K. y Clapham, D.E. (2000) Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.* 275:36211-6.

- Jelacic, T.M., Sims, S.M. y Clapham, D.E. (1999) Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels containing GIRK3. *J. Membr. Biol.* 169:123-9.
- Jelsema, C.L. y Axelrod, J. (1987). Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the  $\beta\gamma$  subunits of transducin and its inhibition by the  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3623-27.
- JongUn, L., YoonWha, O. y Soo, W.K. (2001) Altered Renal Expression of Aquaporin-2 Water Channels in Rats with Experimental Two-Kidney, One Clip Hypertension. *J. Korean Med. Sci.* 16: 462-6.
- Karschin, C., Dissmann, E., Stuhmer, W. y Karschin, A. (1997) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 16:3559-70.
- Kenna, S., Roper, J., Ho, K., Hebert, S., Ashcroft, S.J. y Ashcroft, F.M. (1994) Differential expression of the inwardly-rectifying K-channel ROMK1 in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24:353-6.
- Kennedy, M.E., Nemec, J., Corey, S., Wickman, K. y Clapham, D.E. (1999) GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein-gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274:2571-82.
- Kinlough, C.L., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L. y Hughey, R.P. (2004) MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J. Biol. Chem.* 279:53071-7.
- Kofuji, P., Davidson, N. y Lester, H.A. (1995) Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G $\beta\gamma$  subunits and function as heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6542-6.
- Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 234:187-208.
- Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel proteins. *Nature.* 374:135-41.
- Krapivinsky, G., Medina, I., Eng, L., Krapivinsky, L, Yang, Y. y Clapham, D.E. (1998a) A novel inward rectifier K<sup>+</sup> channel with unique pore properties. *Neuron.* 20:995-1005.

- Krapivinsky, G., Kennedy, M., Nemec, J., Medina, I., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (1998b) G $\beta\gamma$  binding to GIRK4 subunit is critical for G protein gated K<sup>+</sup> channel activation. *J. Biol. Chem.* 273:16946–52.
- Kubo Y. (1996) Effects of extracellular cations and mutations in the pore region on the inward rectifier K<sup>+</sup> channel IRK. *Receptors and Channels.* 4:73-83.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J. Jan, Y. N. y Jan L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier K channel. *Nature* 362: 127–33.
- Kunkel, M.T. y Peralta, E.G. (1995) Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell.* 83:443-9.
- Leaney, J.L., Dekker, L.V. y Tinker A. (2001) Regulation of a G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel by a Ca(2<sup>+</sup>)-independent protein kinase C. *J. Physiol.* 534:367-79.
- Leech, C.A., y Stanfield, P.R. (1981) Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potential and external potassium. *J. Physiol.* 319:295–309.
- Lesage, F., Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M. y Hugnot, J.P. (1994) Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain. *FEBS Lett.* 353:37–42.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. y Barhanin J. (1996) A pH-sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol. Chem.* 271:4183-7.
- Lin, D.H., Sterling, H., Lerea, K.M., Welling, P., Jin, L., Giebisch, G. y Wang, W.H. (2002) K<sup>+</sup> depletion increases protein tyrosine kinase-mediated phosphorylation of ROMK. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283:F671-7.
- Loewi, O. (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.* 189:239–42.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J. y Clapham, D. E. (1987). The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325:321-6.
- Logothetis, D.E. y Zhang, H. (1999) Gating of G protein-sensitive inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Physiol.* 520:630.
- Lomax, A.E., Rose, R.A. y Giles, W.R. (2003) Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K<sup>+</sup> current in adult mouse atria. *Br. J. Pharmacol.* 140:576-84.

- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. y Nichols, C.G: (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372:366-9.
- Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H. y Aldrich, R.W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels*. 1:61-71.
- Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.C. y Guggino, W.B. (1990) A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 57:1117-23
- Lu, Z. (2004) Mechanism of rectification in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Annu. Rev. Physiol.* 66:103-29.
- Lu Z. y MacKinnon R. (1994a) A conductance maximum observed in an inward-rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 104:477-86.
- Lu, Z. y Mackinnon, R. (1994b) Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Nature*. 371:243-6.
- Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S.R., Jan, Y.N. y Jan LY. (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart . *Neuron*. 33:715-29.
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. y Huang, X.Y. (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*. 102:635-46.
- MacKinnon, R. (1991) Determination of the Subunit Stichiometry of a Voltage Activated Potassium Channel. *Nature*. 350:232-5.
- MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555:62-5.
- MacKinnon, R., Aldrich, R.W. y Lee, A.W. (1993) Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. 262:757-9.
- Mao, J., Wang, X., Chen, F., Wang, R., Rojas, A., Shi, Y., Piao, H. y Jiang C. (2004) Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:1087-92.
- Mark, M.D. y Herlitze, S. (2000) G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* 267:5830-6.
- Marples, D., Knepper, M.A., Christensen, E.I. y Nielsen S. (1995) Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 269:C655-64.
- Matsuda, H. y Sperelakis, N. (1993) Inwardly rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 265:H1107-11.

- Matsuda, H. (1991) Effects of external and internal K<sup>+</sup> ions on magnesium block of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in guinea-pig heart cells. *J. Physiol.* 435:83-99.
- Matsuda, H., Saigusa, A. y Irisawa, H. (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by Mg<sup>2+</sup>. *Nature.* 325:156-9.
- Medina, I., Krapivinsky, G., Arnold, S., Kovoor, P., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (2000) A switch mechanism for G<sub>βγ</sub> activation of I(KACh). *J. Biol. Chem.* 275:29709-16.
- Miledi, R., I. (1982) A calcium dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* 215:491-7.
- Mora, S.I. y Escobar, L.I. (2005) Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett.* 579:3019-23.
- Moral, Z., Dong, K., Wei, Y., Sterling, H., Deng, H., Ali, S., Gu, R., Huang, X.Y., Hebert, S.C., Giebisch, G. y Wang, W.H. (2001) Regulation of ROMK1 Channels by Protein-tyrosine Kinase and tyrosine Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 276:7156-63.
- Mullner, C., Vorobiov, D., Bera, A.K., Uezono, Y., Yakubovich, D., Frohnwieser-Steinecker, B., Dascal, N. y Schreibmayer, W.S. (2000) Heterologous facilitation of G protein-activated K(+) channels by β-adrenergic stimulation via cAMP-dependent protein kinase. *J. Gen. Physiol.* 115:547-58.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80:249-57.
- Nichols, C.G. y Lopatin, A.N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171-91.
- Ohmori, H. (1978) Inactivation kinetics and steady-state current noise in the anomalous rectifier of tunicate egg cell membranes. *J. Physiol.* 281:77-99.
- Oliver, D., Baukrowitz, T. y Fakler, B. (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* 267:5824-9.
- Palmer, L.G., Choe, H. y Frindt, G. (1997) Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am. J. Physiol.* 273:F404-10.
- Partiseti, M., Collura, V., Agnel, M., Culouscou, J.M. y Graham, D. (1998) Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett.* 434:171-6.



- Perier, F., Radeke, C.M. y Vandenberg, C.A. (1994) Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying K channel from human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:6240-44.
- Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M.C., Salvatore, L. y Tucker, S.J. (2001) Differential pH sensitivity of Kir 4.1 and Kir 4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir 5.1. *J. Physiol.* 532:359-67.
- Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canun, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A.L. Jr, Fish, F.A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S.H., Wolfe, G., Fu, Y.H. y Ptacek, L.J. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andresen's Syndrome. *Cell.* 105:511-9.
- Ponce, A., Bueno, E., Kentros, C., Vega-Saenz de Miera, E., Chow, A., Hillman, D., Chen, S., Zhu, L., Wu, M.B., Wu, X., Rudy, B. y Thornhill, W.B. (1996) G-protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channel proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *J. Neurosci.* 16:1990-2001.
- Raab-Graham, K.F., Radeke, C.M, y Vandenberg, C.A. (1994) Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport.* 5:2501-5.
- Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iniguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 370:143-6.
- Reyes, R., Lauritzen, I., Lesage, F., Ettaiche, M., Fosset, M. y Lazdunski, M. (2000) Immunolocalization of the arachidonic acid and mechanosensitive baseline traak potassium channel in the nervous system. *Neuroscience.* 95:893-901.
- Rishal, I., Porozov, Y., Yakubovich, D., Varon, D. y Dascal, N. (2005) G $\beta\gamma$ -dependent and G $\beta\gamma$ -independent basal activity of G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 280:16685-94.
- Rogalski, S.L., Appleyard, S.M., Pattillo, A., Terman, G.W. y Chavkin, C. (2000) TrkB activation by brain-derived neurotrophic factor inhibits the G protein-gated inward rectifier Kir3 by tyrosine phosphorylation of the channel. *J. Biol. Chem.* 275:25082-8.
- Romo, X., Hinrichs, M.V., Guzman, L. y Olate, J. (2002) Gas levels regulate *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 63:104-9.

- Ruppersberg, J.P. (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch.* 441:1-11.
- Ruppersberg, J.P., Schöter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. y Pongs, O. (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature.* 345:535-7.
- Ruppersberg, J.P., Stocker, M., Pongs, O., Heinemann, S.H., Frank, R., y Koenen, M. (1991) Regulation of fast inactivation of cloned mammalian IK(A) channels by cysteine oxidation. *Nature.* 352:711-4.
- Sadja, R., Alagem, N. y Reuveny, E. (2002) Graded contribution of the G $\beta\gamma$  binding domains to GIRK channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10783-8.
- Sadja, R., Alagem, N. y Reuveny, E. (2003) Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron.* 39:9-12.
- Sadja, R., Smadja, K., Alagem, N. y Reuveny, E. (2001) Coupling G $\beta\gamma$ -dependent activation to channel opening via pore elements in inwardly rectifying potassium channels. *Neuron.* 29:669-80.
- Sadler, S.E., Maller, J.L. y Cooper, D.M. (1984). Progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase is not mediated via the Bordetella pertussis toxin substrate. *Mol Pharmacol.* 26:526-31.
- Saitoh, O., Kubo, Y., Odagiri, M., Ichikawa, M., Yamagata, K. y Sekine, T. (1999) RGS7 and RGS8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K<sup>+</sup> currents. *J. Biol. Chem.* 274:9899-904.
- Sakmann, B. y Trube, G. (1984) Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol.* 347:659-83.
- Sakura, H., Ammala, C., Smith, P.A., Gribble, F.M. y Ashcroft, F.M. (1995) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 377:338-44.
- Salvador, C., Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G., and Escobar, L.I. (2001) Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:135-47.
- Salvador, C., Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. y Escobar LI. (2003) Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences.* 72:1509-18.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanguinetti, M.C. y Tristani-Firouzi, M., (2000) Delayed and inward rectifier potassium channels. En: Zipes, D.P. and Jalife, J., Editors, (2000) *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, W.B. Saunders, Philadelphia 79-86.
- Sato, K.I., Aoto, M., Mori, K., Akasofu, S., Tokmakov, A.A., Sahara, S. y Fukami, Y. (1996) Purification and characterization of a Src-related p57 protein-tyrosine kinase from *Xenopus* oocytes. Isolation of an inactive form of the enzyme and its activation and translocation upon fertilization. *J. Biol. Chem.* 271:13250-7.
- Schmitz, R., Baumann. G. y Gram, H. (1996) Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J. Mol. Biol.* 260:664-77.
- Schulze-Bahr, E. (2005) Short QT syndrome or Andersen syndrome: Yin and Yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ. Res.* 96:703-4.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M. y Bezanilla, F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16:1159-67.
- Shapiro, M.S., Roche, J.P., Kaftan, E.J., Cruzblanca, H., Mackie, K. y Hille, B. (2000) Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels that underlie the neuronal M current. *J. Neurosci.* 20:1710-21.
- Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M. y Pfaffinger, P. (1993) Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly. *Neuron* 11:67-76.
- Sheng, Y., Tiberi, M., Booth, R.A., Ma, C. y Liu, X.J. (2001) Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr. Biol.* 11:405-16.
- Sheng Y, Montplaisir p. y Liu XJ. (2005) Co-Operation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  in Maintaining G2 Arrest in *Xenopus* Oocytes. *J. Cell. Physiol.* 202:32-40
- Shieh, R.C.; Chang, J.C. y Arreola, J. (1998) Interaction of Ba<sup>2+</sup> with the pores of the cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir2.1 Expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 75:2313-22.
- Shieh, R.C., Chang, J.C. y Kuo, C.C. (1999) K<sup>+</sup> binding sites and interactions between permeating K<sup>+</sup> ions at the external pore mouth of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel (Kir2.1). *J. Biol. Chem.* 274:17424-30.
- Shuck, M.E., Bock, J.H., Benjamin, C.W., Tsai, T.D., Lee, K.S., Slightom J.L. y Bienkowski, M.J. (1994) Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROMK potassium channel. *J. Biol. Chem.* 269:24261-70.
- Silverman, S.K., Lester, H.A. Y Dougherty, D.A. (1996) Subunit stoichiometry of a heteromultimeric G protein-coupled inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 271:30524-8.

- Sim, J.H., Yang, D.K., Kim, Y.C., Park, S.J., Kang, T.M., So, I. y Kim, K.W. (2002) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in guinea pig gastric myocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G137-44.
- Simon, D.B., Karet, F.E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J.H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S.A. y Lifton, R.P. (1996). Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat. Genet.* 14:152-6.
- Smith, P.A., Sellers, L.A. y Humphrey, P.P. (2001) Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in MIN-6 cells. *J. Physiol.* 532:127-42.
- Soejima, M. y Noma, A. (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch.* 400:424-31.
- Standen, N.B. y Stanfield, P.R. (1978) A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J. Physiol.* 280:169-91.
- Stanfield, P.R., Davies, N.W., Shelton, P.A., Sutcliffe, M.J., Khan, I.A., Brammer, W.J. y Conley, E.C.J. (1994). A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg<sup>2+</sup> of the inward-rectifier, IRK1. *J. Physiol.* 478:1-6.
- Sterling, H., Lin, D.H., Gu, R.M., Dong, K., Hebert, S.C., Wang, W.H. (2002) Inhibition of protein-tyrosine phosphatase stimulates the dynamin-dependent endocytosis of romk1. *J. Biol. Chem.* 277:4317-23.
- Stockklausner, C., Ludwig, J., Ruppertsberg, J.P. y Klocker, N. (2001) A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett.* 493:129-33.
- Stockklausner, C. y Klöcker, N. (2003) Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J. Biol. Chem.* 278:17000-5.
- Sui, J.L., Jérôme, P.J. y Logothetis, D.E. (1998) Activation of the atrial KACH channel by the  $\beta\gamma$  subunits of G proteins or intracellular Na<sup>+</sup> ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc. Natl Acad. Sci.* 95:1307-12.
- Takahashi, N., Morishige, K.I., Jahangir, A., Yamada, M., Findlay, I., Koyama, H. And Kurachi, Y. (1994) Molecular cloning and Functional Expression of cDNA Encoding a Second Class of Inward Rectifier Potassium Channels in the Mouse Brain. *J. Biol. Chem.* 269:23274-9.

- Takano, K., Stanfield, P.R., Nakajima, S. y Nakajima, Y. (1995) Protein kinase C-mediated inhibition of an inward rectifier potassium channel by substance P in nucleus basalis neurons. *Neuron*. 14:999-1008.
- Tanemoto, M., Fujita, A., Higashi, K. y Kurachi, Y. (2002) PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron*. 34:387-97.
- Tanemoto, M., Kittaka, N., Inanobe, A. y Kurachi, Y. (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K<sup>+</sup> channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J. Physiol*. 525:587-92.
- Tang, W., Qin, C.L. y Yang XC (1995) Cloning, localization, and functional expression of a human brain inward rectifier potassium channel (hIRK1). *Receptors Channels*. 3:175-83.
- Tarasov, A., Dusonchet, J. y Ashcroft, F. (2004) Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux. *Diabetes*. 53:S113-22.
- Tiran, Z., Peretz, A., Attali, B. y Elson, A. (2003) Phosphorylation-dependent regulation of Kv2.1 Channel activity at tyrosine 124 by Src and by protein-tyrosine phosphatase epsilon. *J. Biol. Chem*. 278:17509-14.
- Tokmakov, A., Iwasaki, T., Itakura, S., Sato, K., Shirouzu, M., Fukami, Y. y Yokoyama, S.\* (2005) Regulation of Src kinase activity during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev. Biol*. 278:289-300.
- Tong, Y., Brandt, G.S., Li, M., Shapovalov, G., Slimko, E., Karschin, A., Dougherty, D.A. y Lester, H.A. (2001). Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol*. 117:103-18.
- Tucker, S.J., Imbrici, P., Salvatore, L., D'Adamo, M.C. y Pessia, M. (2000). pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia. *J. Biol. Chem*. 275:16404-07.
- Tusnady, G.E., Bakos, E., Varadi, A. y Sarkadi, B. (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett*. 402:1-3.
- Vandenberg, C.A. (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84:2560-4.
- Vivaudou, M., Chan, K.W., Sui, J.L., Jan, L.Y., Reuveny, E. y Logothetis, D.E. (1997) Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of

- the KACH channel, using functional homomeric mutants. *J. Biol. Chem.* 272:31553-60.
- Wang, W. H., Geibel, J. y Giebisch, G. (1993) Mechanism of Apical K<sup>+</sup> Channel Modulation in Principal Renal Tubule Cells *J. Gen. Physiol.* 101:673-94.
- Wang, Z.W., Kunkel, M.T., Wei, A., Butler, A. y Salkoff, L. (1999) Genomic organization of nematode 4TM K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci.* 868:286-303.
- Wang, W., Lerea, K.M., Chan, M. y Giebisch, G. (2000) Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278:F165-71.
- Wang, W.H., Lin, D.H., Sterling, H. (2002) Regulation of ROMK channels by protein tyrosine kinase and tyrosine phosphatase. *Trends Cardiovasc. Med.* 12:138-42.
- Wei, Y., Bloom, P., Lin, D., Gu, R. y Wang, W.H. (2001) Effect of dietary K intake on apical small-conductance K channel in CCD: role of protein tyrosine kinase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281:F206-12.
- Werner, P., Hussy, N., Buell, G., Jones, K. A., and North, R. A. (1996). D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 49:656-61.
- Wettschureck, N. y Offermanns S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific function *Physiol Rev.* 85:1159-204.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. y Neckers L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:8324-8.
- Wible, B.A, De Biasi, M., Majumder, K., Taglialatela, M. y Brown, A.M. (1995) Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ. Res.* 76:343-50.
- Wischmeyer, E, Doring, F. y Karschin, A. (1998) Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273:34063-8.
- Wonderlin, W.F. y Strobl, J.S. (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr. Biol.* 154:91-107.
- Xu, H., Yang, Z., Cui, N., Chanchevalap, S., Valesky, W.W. y Jiang, C. (2000) A single residue contributes to the difference between Kir4.1 and Kir1.1 channels in pH sensitivity, rectification and single channel conductance. *J. Physiol.* 528:267-77.

- Xu, Z.C., Yang, Y. y Hebert, S.C. (1996) Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:9313-9.
- Yamada, M., Inanobe, A. y Kurachi, Y. (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* 50:723-60.
- Yang, J., Jan, Y. N y Jan, L. Y. (1995) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 14:1047-54.
- Yang, Z., Xu, H., Cui, N., Qu, Z., Chanchevalap, S., Shen, W. y Jiang, C. (2000). Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO<sub>2</sub> and pH. *J. Gen. Physiol.* 116:33-45.
- Zang, W.J., Yu, X.J. y Boyett, M.R. (1995) Barium block of the muscarinic potassium current in guinea-pig atrial cells. *Pflugers Arch.* 430:348-57.
- Zeidner, G., Sadjja, R. y Reuveny, E. (2001) Redox-dependent gating of G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 276:35564-70.
- Zhang, Q., Pacheco, M.A. y Doupnik, C.A. (2002) Gating properties of GIRK channels activated by Galpha(o)- and Galpha(i)-coupled muscarinic m2 receptors in *Xenopus* oocytes: the role of receptor precoupling in RGS modulation. *J. Physiol.* 545:355-73.
- Zhao, Q., Kawano, T., Nakata, H., Nakajima, Y., Nakajima, S. y Kozasa, T. (2003) Interaction of G protein beta subunit with inward rectifier K(+) channel Kir3. *Mol. Pharmacol.* 64:1085-91.
- Zhou, H., Tate, S.S. y Palmer, L.G. (1994) Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am. J. Physiol.* 266:C809-24.
- Zhou, Y. y MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333:965-75.
- Zhu, L. (1997) In vitro site-directed mutagenesis using the unique restriction site elimination (USE) method. *Methods in Mol. Biol.* 57:13-29.

## Apéndice A: Técnicas.

### Condiciones de amplificación para la PCR.

Mezcla de reacción

Reactivos	[final]
Buffer de PCR	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTPS	0.2 mM
Iniciador sentido	0.4 mM
Iniciador antisentido	0.4 mM
ADN	~ 50 ng
Enzima	3.5 unidades

La Mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µl y los fragmentos se amplificaron en un termociclador Perkin elmer (modelo) utilizando los ciclos de amplificación que se describen a continuación.

Ciclos de amplificación

# ciclos	T °C	minutos
1	94	5
30	94	1
	54	1
	72	1
1	72	10
1	4	∞

### Transformación.

1. Mezclar 200 µl de **células competentes** DH5α con 0.05-0.5 µg de ADN del plásmido.
2. Incubar sobre hielo 30 min.
3. Dar un shock térmico a **42 °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 °C por 1 hora.
7. Centrifugar a **2500** rpm a 4 °C por **5** min.
8. Decantar el sobrenadante.
9. Agregar 200 µl de LB y resuspender por inversión .
10. Agregar 200 µl de células a una caja de cultivo LB con antibiótico.
11. Incubar a 37 °C toda la noche.
12. Checar colonias.



### Preparación de células competentes

1. Incubar 5 ml de medio LB con una colonia bacteriana DH5 $\alpha$ , o con 10 ml 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. Checar el crecimiento hasta que alcance una OD de 0.3 a 0.5. (aprox. 3h)
4. Centrifugar a 4000 rpm por 5 min a 4 °C en un tubo estéril.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 1ml de solución **A** fría. Llevar las células a un volumen final de 10ml con la solución **A** y centrifugar como en el paso 4. Decantar el sobrenadante
6. Resuspender el botón en 1ml de solución **B** fría. Llevar aun volumen final de 10ml con la solución **B**.
7. Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células como n el paso 4.
8. Decantar el sobrenadante. Secar el tubo lo más posible.
9. Muy suavemente resuspender las bacterias en 2ml de solución **B**.
10. Hacer alícuotas de 200  $\mu$ l y agregar 10% de glicerol estéril. Mezclar por inversión. Congelar estos stocks en hielo seco y almacenar a -70 °C.

Solución <b>A</b>	[mM]
MOPS pH7.0	10
Cloruro de Rubidio	10

Solución <b>B</b>	[mM]
MOPS pH 6.5	100
CaCl <sub>2</sub>	50
RbCl	10

Nota: Estas soluciones se preparan un día antes y se filtran para usarlas.

### Medio LB 1X líquido / bacterias.

Bactotripton	10 g.	5 g.
Extracto de levadura	5 g.	2.5 g
NaCl.	10 g	5 g
Aforar con H <sub>2</sub> O a:	1000 ml.	500 ml

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave.  
Guardar a temperatura ambiente.

### Medio LB 1X sólido para bacterias.

1. A 1000 ml de LB 1X líquido agregar 15 g de agar.
2. Colocar en cajas y guardar 4 °C.

Se agrega antibiótico dependiendo la resistencia especificado para el vector específico.

### Gel Agarosa 1% para ADN

Agarosa	0.3 g
TBE1X	30 ml
Bromuro de etidio	1.4 µl

### Buffer TBE

StocK	[ ] final 1X (sol de trabajo)
Tris base	89 mM
Acido borico	89 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 mM

### Colorante para corrimiento en gel (ADN).

Azul de bromofenol	0.25%
Xileno cianol FF	0.25%
Glicerol en agua	30%

Guardar a 4 °C.

### Gel Agarosa ARN

1. Disolver 0.3g de agarosa en 30 ml de H<sub>2</sub>O.
2. Añadir 3 ml de MOPS 10X.
3. Añadir 1.5 ml de formaldehído.
4. Vaciar en la caja.

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

### MOPS 10X.

	1000 ml	[ ] final
MOPS (libre de ácido)	<b>41.86 g</b>	0.4 M
Acetato de sodio	<b>6.8 g</b>	0.1 M
EDTA 0.5 M pH 8.0	<b>20 ml</b>	0.01 M

Llevar a pH 8.0 con 6.8 ml de NaOH 10N. Filtrar y guardar a 4 °C tapado con aluminio.

## Western Blot

Primeramente se determinó la dilución del anticuero primario y secundario utilizando a la proteína EGFP pura (clontech). Cuando se establecieron las condiciones se prosedió al tatamiento de las muestras utilizando el siguiente protocolo:

### 1. Obtención de las fracciones membranales de los ovocitos de la rana *Xenopus*.

- Homogenizar los ovocitos en la solución de extracción. 2µl/ovocito.

Sacarosa	250 mM
EDTA	1 mM
TRIS	10 mM
Ajustar pH 7.6	
Agregar 1 pastilla de inhibidores de proteasas a 10 ml de la sol de extracción (mini Complete, Roche)	

- Centrifugar a 4000 g por 10 min a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa.
- Centrifugar a 4000 g por 10 min a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa.
- Centrifugar lo que corresponda a 10 ovocitos a 17 000 g por 20 minutos a 4°C.
- El botón contiene la fracción membrana de alta densidad que corresponde a la membrana plasmática y la fase acuosa la fracción membrana de alta dencidad (vesículas microsomales) [Marples *et al.* 1995, JongUns *et al.* 2001].

### 2. Separación de las proteínas por electroforesis.

- La electroforesis se llevó acabo utilizando un gel convencional SDS- poliacrilamida al 5% como concentrador y al 10% como separador.

Gel concentrador 5% acrilamida		Gel separador 10% acrilamida	
H <sub>2</sub> O	3.4 ml	H <sub>2</sub> O	4.0 ml
30% Acrilamida*	830 µl	30% Acrilamida*	3.3 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	630 µl	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
10 % SDS	50 µl	10 % SDS	100 µl
10% APS	50 µl	10% APS	100 µl
TEMED	5 µl	TEMED	4 µl

Los valores reportados son para la preparación de dos geles.

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

- La fracción membranal de 10 ovocitos fue resuspendido en 20  $\mu$ l de buffer de carga (SDS-gel loading buffer, Laemmli). La relación fue de 2 $\mu$ l de buffer por ovocito.

Buffer de carga Laemmli	
Tris -HCl, pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	25 %
SDS	2 %
Azul de bromofenol	0.01 %
$\beta$ -mercaptoetanol	5%

- Las muestras fueron calentadas a 95 °C por 5 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido full range rainbow (Amersham).
- Correr las muestras a 70 V hasta pasar el gel de concentración.

Buffer de electroforesis Tris-glicina	
Tris base	25 mM
Glicina	250 mM
SDS	0.1 %

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

- Correr las muestras en el gel separador a 110 V.

### 3. Transferencia semihúmeda de las proteínas a membranas de PVDF.

- Humectar la membrana de PVDF en metanol 100%.
- Remojar en la solución de transferencia el gel separador, la membrana de PVDF y los cojinetes por un lapso de 15 minutos.

Solución de transferencia	
Tris base	25 mM
Glicina	250 mM
SDS	0.1 %
Metanol	20 %

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

- Hacer el sándwich especificado para la transferencia de proteínas siguiendo las especificaciones del Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad).
- Transferir las proteínas a 7 V por 1 hora.
- Teñir el gel para comprobar la eficiencia de la transferencia.

### Bloqueo de la membrana

- Incubar la membrana en una disolución de TBST con el agente bloqueador al 0.4% (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) durante una hora a T° ambiente.

TBS	
NaCl	137 mM
Tris base	20 mM

Ajustar pH a 7.6  
TBST: Para un litro de TBS agregar 1 ml de Tween 20

- Enjuagar una vez con TBST.

### Incubación de la membrana con los anticuerpos.

- Incubar la membrana toda la noche a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario anti GFP en una dilución 1:1000 (monoclonal antibody JL-8, Clontech). El anticuerpo se diluyó en TBST con 0.2% del agente bloqueador.
- Enjuagar la membrana con TBST.
- Lavar la membrana con TBST 3 veces por 10 min a T° ambiente y agitación vigorosa
  - Lavar la membrana con TBST a T° ambiente por 15 min con agitación vigorosa.
- Incubar la membrana una hora a T° ambiente con el anticuerpo secundario HRP-conjugado de cabra anti-ratón en una dilución 1: 50000. El anticuerpo se diluyó en TBST con 0.2% del agente bloqueador.
- Lavar la membrana con TBST 3 veces por 10 min a T° ambiente y agitación vigorosa
- Lavar la membrana con TBST a T° ambiente por 15 min con agitación vigorosa.

### 5. Detección

- Revelar la membrana con el kit ECL Advance de Amersham siguiendo las instrucciones del proveedor.
- Exponer la membrana a la placa radiográfica
- Revelar y fijar la placa radiográfica.

**Apéndice B: *Artículos publicados.***



ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1512 (2001) 135–147



www.bba-direct.com

## Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel

Carolina Salvador <sup>a</sup>, Martin Martinez <sup>b</sup>, S. Ivonne Mora <sup>a</sup>, Waskar Egado <sup>a</sup>,  
Jose M. Farias <sup>b</sup>, Gerardo Gamba <sup>c</sup>, Laura I. Escobar <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-250, México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-250, México, D.F., Mexico

Received 27 October 2000; received in revised form 8 March 2001; accepted 8 March 2001

### Abstract

*Xenopus laevis* oocytes codify a G-protein-activated inward rectifier potassium channel (GIRK5 or Kir3.5). Coinjection of other GIRKs, the muscarinic m2 receptor, or G $\beta\gamma$  protein cRNAs is required to observe functional GIRKx-GIRK5 heteromultimers in oocytes. Studies with GIRK2 isoforms have shown that the size of the amino or carboxyl terminus plays a crucial role on giving functional K<sup>+</sup> channels. In this work we studied the properties of a GIRK5 with 25 amino acids deleted toward its amino-terminal domain. Injection of GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA alone displayed large basal and transient inward rectifying currents in oocytes. The instantaneous currents reached a stationary level after a long duration voltage pulse (10 s). For this relaxation, fast ( $\tau_1$ ) and slow ( $\tau_2$ ) time constants were estimated at different voltages. Recovery from inactivation followed a monoexponential function ( $\tau = 0.95 \pm 0.07$  s). By contrast with other inward rectifier channels, blockade of GIRK5- $\Delta$ 25 by extracellular Ba<sup>2+</sup> was voltage-independent ( $K_d = 102 \pm 2$   $\mu$ M), suggesting the presence of a Ba<sup>2+</sup> site at the external channel vestibule. To confirm this hypothesis, the Ba<sup>2+</sup> sensitivity of two charged mutants GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) and GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) at each of the external loops was determined. GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) and GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) showed a 100-fold and 2-fold higher affinity to Ba<sup>2+</sup>, respectively, supporting the existence of this Ba<sup>2+</sup> binding site. © 2001 Published by Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Inward rectifying potassium channel; Barium; G-protein activated channel; *Xenopus* oocyte

### 1. Introduction

The G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRK or Kir3 subfamily) are critical mediators of cell excitability and effectors of many G-protein-coupled receptors [1]. For example, acetyl-

choline binds to cardiac muscarinic receptors (m2) and then activates I<sub>KACH</sub>, slowing heart rate. This atrial channel exists as a heteromultimer composed of two GIRK1 and two GIRK4 subunits [2]. So far the GIRK conducting K<sup>+</sup> channels have been observed as an aggregation of two different GIRK subunits. GIRK2 and GIRK3 are found in the brain where they possibly form heteromeric channels with GIRK1. Coexpression of GIRK1 and GIRK2 produces functional channels in *Xenopus* oocytes like the

\* Corresponding author. Fax: +52-5-623-2241;  
E-mail: laurae@servidor.unam.mx

native G-protein-coupled inward rectifiers found in brain [3]. In contrast, some GIRK2 isoforms and GIRK4 alone also form functional G $\beta\gamma$ -gated homomultimers in various heterologous expression systems [2–5]. The mutants GIRK1(F137S) and GIRK4(S143T) form homomeric functional channels with activity comparable to the wild-type heteromeric G-protein-gated channels [6].

Alternative splicing at the 3'-end of the open reading frame of GIRK3.2 cRNA generates the four isoforms GIRK3.2a, GIRK3.2b, GIRK3.2c and GIRK3.2d [7–9]. GIRK3.2d is 18 amino acids shorter at the N-terminal end than of Kir3.2c and can form functional channels. In contrast, Kir3.2c can only form functional GIRK channels with GIRK3.2a or GIRK3.1 [9]. It has been stated that both the N- and C-terminal ends of Kir3.2 isoforms play complex roles in the regulation of channel activity in GIRK channels composed of homomeric assemblies of GIRK3.2 isoforms [9].

The GIRK5 (Kir3.5) has been cloned from *Xenopus laevis* oocytes, the most widely used expression system [10]. Oocytes overexpressing GIRK5 in the absence of GIRK1 show very small Ach-stimulated currents [10]. The GIRK5 gene has three in-frame ATGs which could give rise to three GIRK5 proteins with different N-terminal sizes [10]. Whether all or some of these GIRK5 isoforms are synthesized in vivo is still an open question.

A small endogenous inward rectifying K<sup>+</sup> current (Xir) can be recorded in some *Xenopus* oocytes [11,12]. Therefore, we suspected that Xir could comprise an assembly of GIRK5 isoforms. To establish the functionality of likely GIRK5 isoforms derived from oocytes, we isolated by RT-PCR a GIRK5 homologue that was 25 amino acids shorter at its N-terminal end (GIRK5- $\Delta$ 25). Oocytes injected with cRNA for GIRK5- $\Delta$ 25 expressed large basal currents in the absence of coexpressed muscarinic receptor (i.e. m2) or G-protein subunits.

GIRK5- $\Delta$ 25 channels displayed an instantaneous component with a prolonged inactivation profile (10 s) at high K<sup>+</sup> without Na<sup>+</sup>. GIRK5- $\Delta$ 25 channels were also blocked by extracellular Ba<sup>2+</sup> in a voltage-independent manner. In order to study the GIRK5- $\Delta$ 25 Ba<sup>2+</sup> binding site, we focused on the possible electrostatic interaction between Ba<sup>2+</sup> and two amino acid residues at the external loops of GIRK5- $\Delta$ 25.

Therefore, we mutated to the negatively charged residue glutamate (E) the amino acids N129 and K157. We obtained a decrease by two orders of magnitude in the  $K_d$  for Ba<sup>2+</sup> block with the GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) mutant. By contrast, GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) had only a slight change in its  $K_d$ . These results suggest that the amino acid residue position in the vestibule of a Kir channel is crucial in the electrostatic interaction with Ba<sup>2+</sup>.

Preliminary results of this study were presented in abstract format [12].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Molecular biology

Total RNA was obtained from 0.8 g of defolliculated *Xenopus* oocytes following the cesium chloride method [13]. RT-PCR experiments were performed to synthesize cDNA from 5  $\mu$ g total RNA (M-MLV reverse transcriptase, Gibco). Two primers were designed based on the amino acid sequence homology with GIRK4 and the GIRK5 clone previously isolated from *X. laevis* oocytes [10]. The nucleotide sequences for these primers (Gibco) were: 5'-CAT CGT CGA CAT GGC AAG GGA TTT AAG GGT CTC TAT G-3' (sense) and 5'-GAA ATG TAT CAA TGT TTT TCT GCA GTC AGT CTG GCT GTG-3' (antisense). A 1214 bp fragment was amplified by PCR either with the *Taq* polymerase (Gibco) or the High Expand enzyme (Boehringer Mannheim). The same result was obtained with the RNA from other frogs ( $n=3$ ). The fragment was purified from an agarose gel (1%) by the Gene Clean method and subcloned in the pRSSP6013A3-UWE vector, pBF. DH5 $\alpha$  cells were transformed. The full GIRK5 codifying region was amplified by PCR with the primers 5'-AAA GGT CGA CAT GAT TCC TGA AAG AAT GGC-3' (sense) and 5'-AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTC GCC TGT ATC AAA G-3' (antisense). The fragment (300 bp) and the PBF-GIRK5- $\Delta$ 25 construct were incubated with *SalI* and *XhoI*. Ligation was performed with T4 DNA Ligase (Gibco). Purified DNAs (Maxi-prep, Qiagen) were sequenced automatically (ABI Prism 310, Perkin Elmer) and manually (thermo-sequenase, Amersham Life Science).



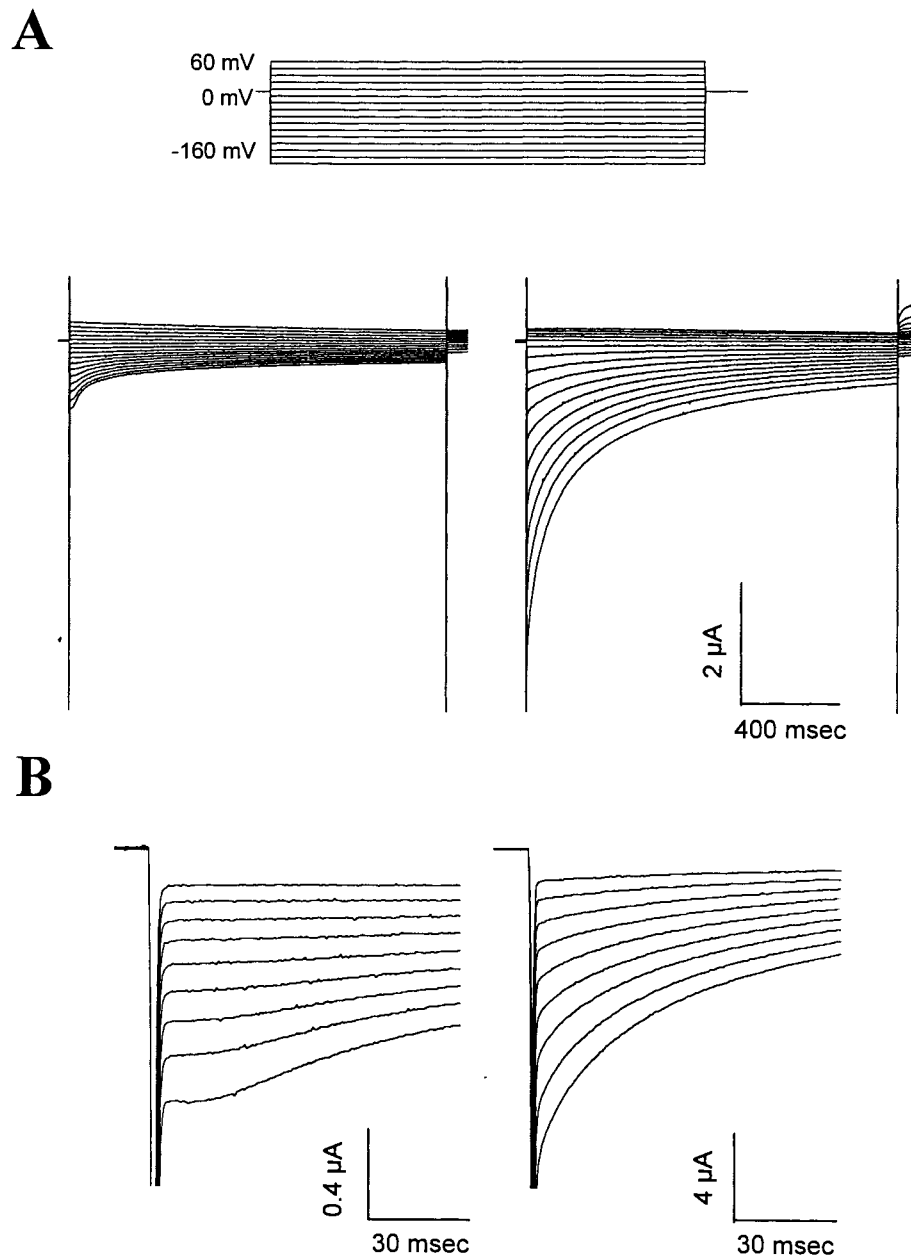


Fig. 1. (A) Current traces were recorded in high  $K^+$  (118 mM) solutions for injected *Xenopus* oocytes with GIRK5 (left) and GIRK5- $\Delta$ 25 cRNAs (right). Voltage pulses from  $-160$  to  $60$  mV were applied during  $1500$  ms with increments of  $15$  mV. The pulse protocol is shown at the top of the figure. The HP was set at  $0$  mV to inactivate most of the endogenous voltage-dependent ion channels. Traces are shown without subtracting linear components. (B) The above traces are shown with a different scale (vertical bar represents  $0.4$  and  $4$   $\mu$ A for GIRK5 and GIRK5- $\Delta$ 25 currents, respectively) during the first  $100$  ms. Inward currents were recorded from oocytes after 2 days of injection ( $10$  ng of cRNA).

$5$ – $20$  ng of GIRK5 wild-type and GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA transcribed in vitro (RNA polymerase SP6, Gibco) were injected into oocytes for electrophysiological assays.

*X. laevis* females were purchased from Carolina Biological Supply Company, USA. Defolliculated oocytes were obtained according to [14].

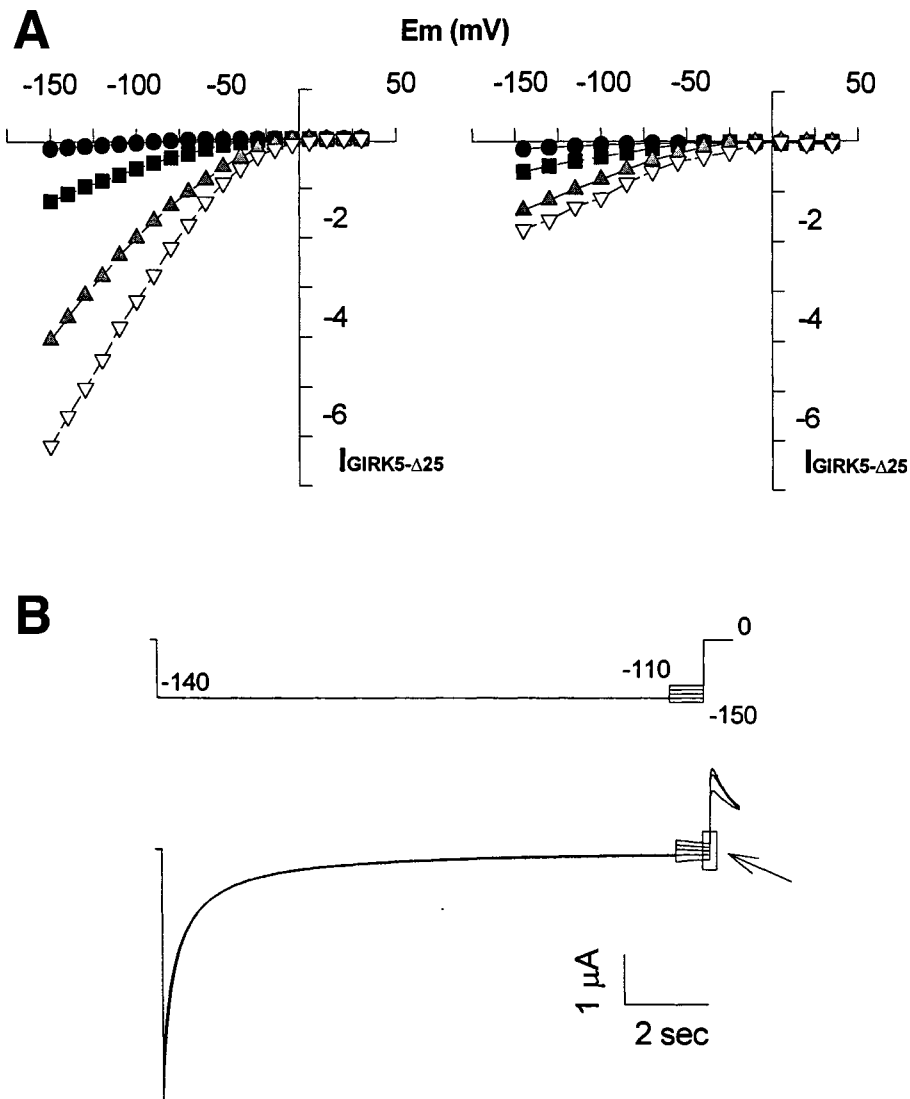


Fig. 2. I-V relationship of GIRK5- $\Delta$ 25. (A) The current-voltage relationships are shown for the instantaneous current (left) and for the current at the end of the pulse (270 ms, right) at different external  $K^+$  concentrations (118 ( $\nabla$ ), 75 ( $\blacktriangle$ ), 50 ( $\blacksquare$ ) and 20 ( $\bullet$ ) mM). The instantaneous component of the current was the value measured when the slope of capacitive current changed. This figure illustrates the substantial decay of GIRK5- $\Delta$ 25 currents with time. Long pulses ( $>11$  s), were required in order to reach the steady-state current level. (B) The protocol that was applied to subtract the leak current is shown at the top. The inward currents were measured with a long pulse (13 s) at  $-140$  mV to inactivate completely the GIRK5- $\Delta$ 25 channels. Then, several current traces were registered from  $-150$  to  $-110$  mV with 10 mV steps to develop only leak currents. The linear part of these traces allowed an estimate of the membrane resistance; the leak current was then subtracted off-line from the experimental data.

## 2.2. Electrophysiological assays

Recordings were made 1–3 days after cRNA injection, with a two-microelectrode voltage-clamp technique (Geneclamp 500, Axon Instruments). Borosilicate microelectrodes were filled with 3 M KCl and had resistances of 0.5–5 M $\Omega$ . Membrane potential and current signals were digitized at a rate of 10

kHz with a 12-bit AD/DA converter (TL-1 Labmaster, Axon Instruments) and filtered through a four-pole low-pass Bessel filter at a frequency of 2–5 kHz. Membrane potential and current signals were stored and analyzed off-line in a Pentium PC with pCLAMP v. 6.0, Microsoft Excel v. 2000 and SigmaPlot, v. 2.0. Pooled data were expressed as mean  $\pm$  S.E. Unless otherwise indicated, current

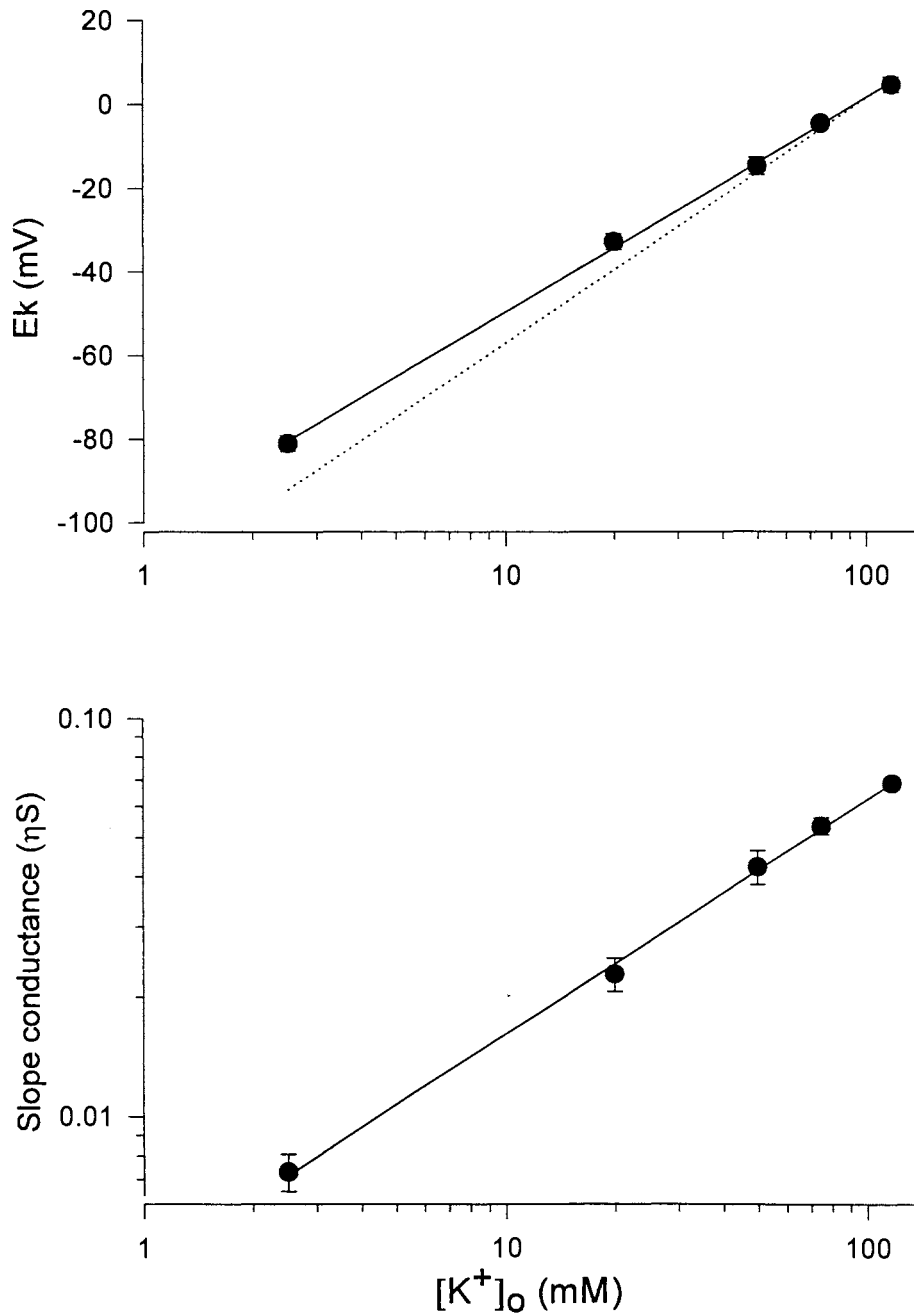


Fig. 3. Selectivity and permeation properties of GIRK5- $\Delta$ 25. (Top)  $E_k$  as a function of  $[K^+]_o$ . Continuous line represents the linear regression fit to the experimental data; the fitted slope was  $50.0 \pm 2.9$  mV. Dotted line indicates the Nernst equation prediction with a slope of 58 mV for a  $K^+$  selective electrode. (Bottom) The slope conductance as a function of  $[K^+]_o$ . The linear regression fit (continuous line) had a slope of 0.586.

traces are shown after subtraction of the linear components. The leak component was subtracted off-line with a protocol applied after a long pulse to obtain only leak current (Fig. 2A, see legend for details). All

experiments were carried out at room temperature (22–24°C). Oocytes were placed in a 1 ml chamber and perfused with solution. Electrode impalement and measurement of oocyte passive properties were

Table 1

Comparison of the time constants for the fast ( $\tau_1$ ) and the slow ( $\tau_2$ ) components of GIRK5- $\Delta$ 25 and mutants

$E_m$ (mV)	GIRK5- $\Delta$ 25		GIRK5- $\Delta$ 25(N129E)		GIRK5- $\Delta$ 25(K157E)	
	$\tau_1$ (ms)	$\tau_2$ (ms)	$\tau_1$ (ms)	$\tau_2$ (ms)	$\tau_1$ (ms)	$\tau_2$ (ms)
-160	55.07 $\pm$ 0.36	465.91 $\pm$ 19.6	50.06 $\pm$ 1.15	554.20 $\pm$ 12.2	59.90 $\pm$ 1.23	486.52 $\pm$ 17.6
-145	60.04 $\pm$ 0.76	476.04 $\pm$ 16.9	70.88 $\pm$ 0.23	543.48 $\pm$ 17.4	64.46 $\pm$ 2.23	476.91 $\pm$ 21.6
-130	69.33 $\pm$ 0.84	502.54 $\pm$ 21.1	78.44 $\pm$ 0.45	518.35 $\pm$ 23.4	72.95 $\pm$ 2.34	516.06 $\pm$ 19.2
-115	74.31 $\pm$ 1.49	509.19 $\pm$ 33.6	77.71 $\pm$ 1.12	484.46 $\pm$ 39.9	78.68 $\pm$ 5.76	535.95 $\pm$ 53.6
-100	82.40 $\pm$ 3.45	529.58 $\pm$ 39.8	95.67 $\pm$ 7.56	443.14 $\pm$ 82.7	92.11 $\pm$ 6.22	552.02 $\pm$ 62.5

The relaxation was measured in 118 mM  $[K^+]_o$  ( $n=3$ ; mean  $\pm$  S.E.).

performed in normal Ringer solution (mM): NaCl 117, KCl 2.5,  $CaCl_2$  1.8, HEPES 5, pH 7.4. For selectivity experiments,  $Na^+$  was replaced with variable  $K^+$  concentrations (2.5, 20, 50, 75, and 118 mM). Functional expression of GIRK5 and GIRK5- $\Delta$ 25 was studied in high  $K^+$  (118 mM).

### 3. Results

#### 3.1. Isolation of GIRK5- $\Delta$ 25 from *X. laevis* oocytes

Since the GIRK5 gene had been already cloned [10], the easiest step to obtain a truncated variant was by RT-PCR. To overcome the intrinsic problems of this technique, we worked with three independent total RNA samples derived from different frogs. In our study primers were designed to amplify the coding sequence from the third start codon of the GIRK5 cDNA previously reported [10]. We obtained the GIRK5 cDNA and GIRK5 with 25 amino acids deleted at the N-terminal domain, GIRK5- $\Delta$ 25. We sequenced the three clones isolated from different frogs. Based on the same oligonucleotide sequence of these samples, using either the *Taq* polymerase or the more reliable High Expand enzyme, we concluded that no artifactual variants were amplified with this procedure.

In comparison with the GIRK5 channel previously cloned [10], the GIRK5- $\Delta$ 25 isolated in this work showed an arginine at position 429 instead of a leucine and a lack of a glycine at position 430 at the end of the intracellular carboxyl domain. One clone out of three had a threonine at position 190 instead of an isoleucine in the M2 domain. These results suggest that the GIRK5 gene displays polymorphism.

#### 3.2. Functional expression in oocytes

Variable amounts of GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA (5–20 ng) were injected into oocytes, yielding an approximately linear relationship between the amount of cRNA injected and the current observed (not shown). Inward inactivating currents were recorded in high  $K^+$  (118 mM; Fig. 1) at the second day with an injection of 10 ng of GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA. Oocytes expressing inward potassium currents higher than 5  $\mu$ A were used for recording. GIRK5- $\Delta$ 25 homomultimers showed an instantaneous current that decayed slowly to a steady state and increased in amplitude with the hyperpolarizing pulse.

If the GIRK5- $\Delta$ 25 activity were caused by its association with the endogenous oocyte GIRK5 subunit and if subunits associated more or less randomly in all possible combinations, one would expect less current with higher amounts of GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA or during longer times of channel expression over a relatively constant background of endogenous GIRK5. As shown in Fig. 1B, this is not the case. As more GIRK5- $\Delta$ 25 cRNA was injected more current was measured. This also happened with the recording time (3–4 days after injection). We have also injected the GIRK5 wild-type cRNA (i.e. the full gene) into the oocytes, and inward currents were not observed under the same conditions (not shown).

#### 3.3. $K^+$ -dependent activation and permeation properties of GIRK5- $\Delta$ 25 homomultimers

I-V relationships for the instantaneous currents and for the currents at the end of the 10 s pulse were estimated for GIRK5- $\Delta$ 25 channels in variable  $[K^+]_o$  (Fig. 2). Whole-cell currents were recorded in 2.5, 20, 75 and 118 mM  $[K^+]_o$ . Currents were elicited

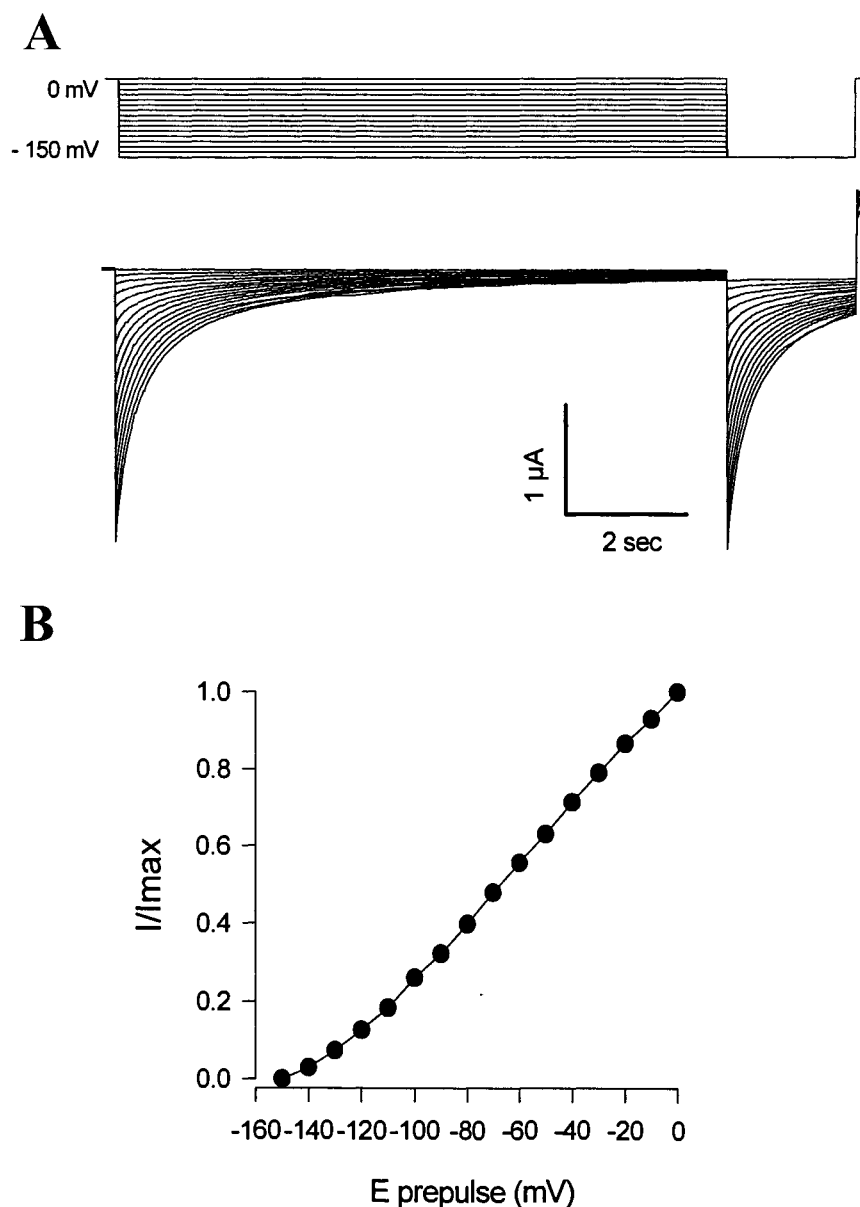


Fig. 4. Steady-state inactivation of the inward rectifying  $K^+$  current. (A) Traces show unsubtracted membrane currents elicited with the pulse protocol shown at the top, in 118 mM  $[K^+]_o$ . (B) The steady-state inactivation induced by a 10 s prepulse was evaluated measuring the instantaneous current at the test pulse ( $-150$  mV) and plotted as a function of the prepulse potential (see text for more details).

from a holding potential (HP) of 0 mV, with the pulse protocol shown at the top of Fig. 1. Off-line subtraction of leak currents was performed with the protocol shown in Fig. 2B (for details see figure legend). Like other inward rectifier potassium channels, the current amplitude of GIRK5- $\Delta$ 25 channels was dependent on the  $[K^+]_o$  at all voltages and the I-V curves were shifted with respect to  $[K^+]_o$ .

The zero current potential was calculated for each I-V curve at all  $[K^+]_o$  ( $n=3$ ) and it was compared with the value predicted by the Nernst equation (Fig. 3, top). The experimental points were very close to the ones estimated except for concentrations lower than 20 mM. Endogenous  $Na^+$  and  $Cl^-$  currents may become apparent in the oocytes at low  $[K^+]_o$ . The linear regression fit of the data in a semiloga-

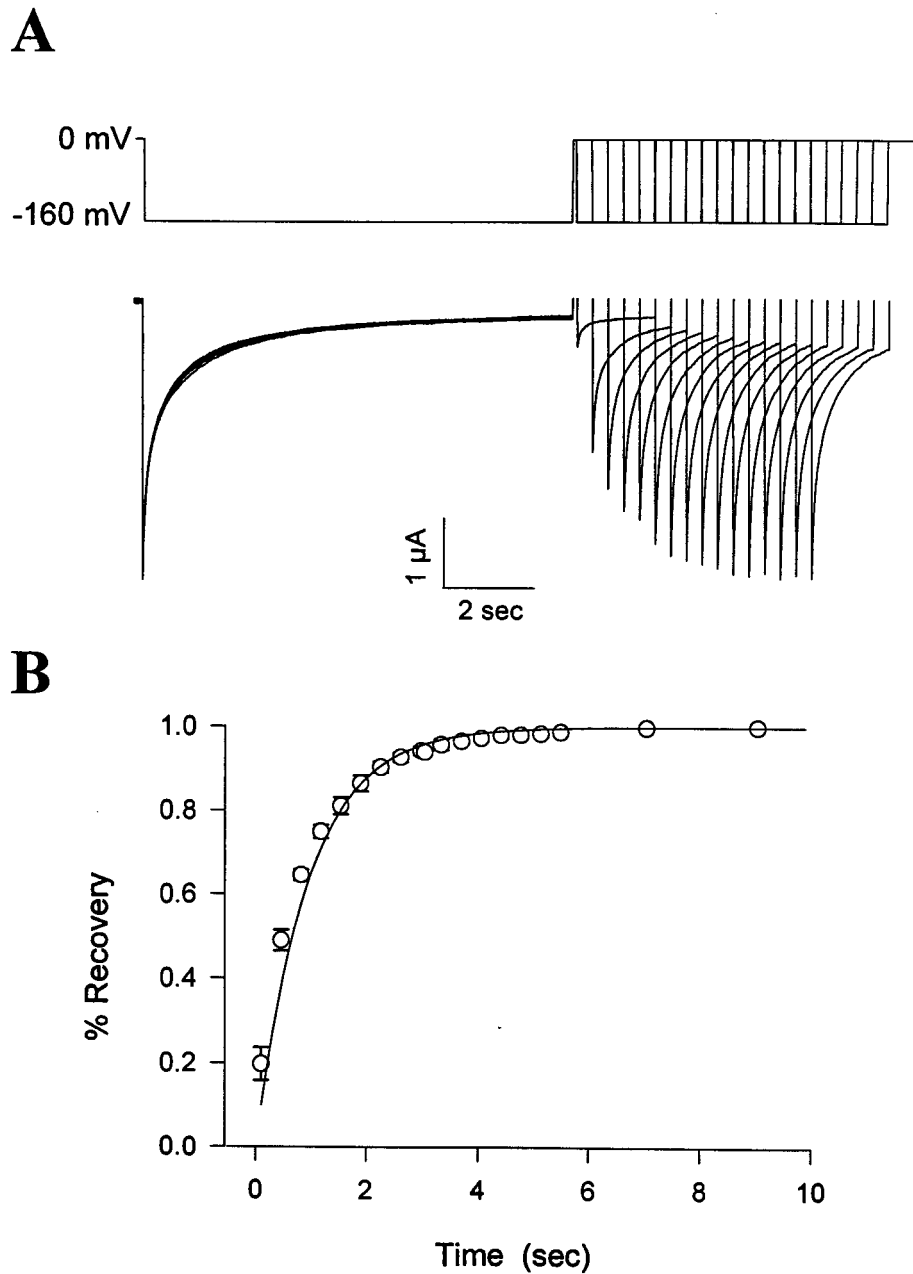


Fig. 5. Recovery from the voltage-dependent inactivation. (A) Time course of the recovery at 0 mV from the steady-state inactivation after a prepulse (9 s) to  $-160$  mV. The recovery was evaluated from the instantaneous current elicited by a test pulse to  $-160$  mV applied at progressive periods (between 10 and 10000 ms) after the conditioning prepulse. (B) Instantaneous current recovery as a function of the interval duration. Data were fitted to a monoexponential function with  $\tau_1 = 0.95$  ms.

rithmic scale had a slope value of  $50.0 \pm 2.9$  mV, close to the 58 mV/decade change in  $[K^+]_o$  for a  $K^+$  selective electrode (dotted line), indicating that GIRK5- $\Delta$ 25 channels were mainly selective for potassium ions.

Fig. 3 (bottom) shows the conductance depen-

dence of GIRK5- $\Delta$ 25 channels on  $[K^+]_o$ . The slope conductance was determined by fitting the linear part (between  $-150$  and  $-70$  mV) of the instantaneous I-V curve at the different  $[K^+]_o$  and plotted in a double logarithmic scale. This relationship was well described by the power function  $g_{\text{slope}} = A ([K^+]_o)^{0.586}$ , where

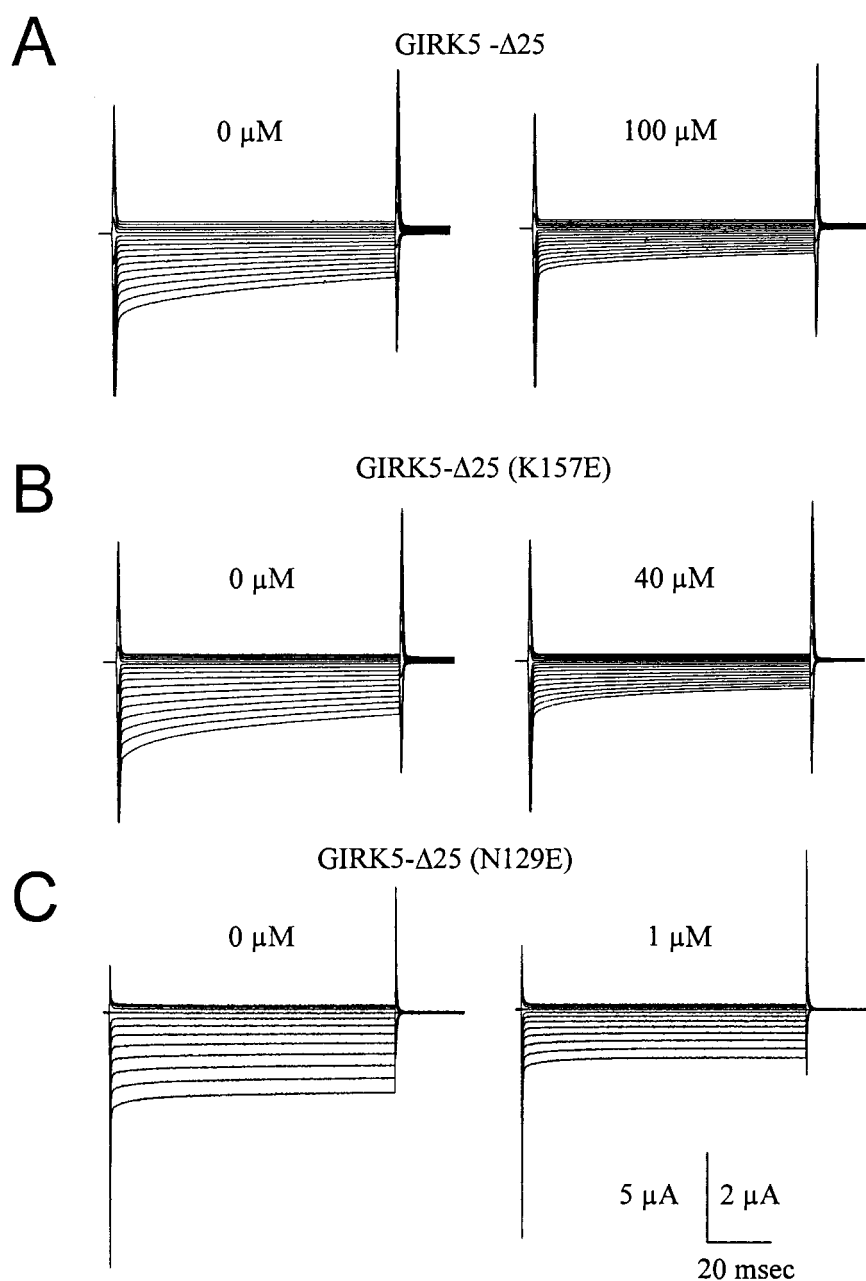


Fig. 6. Effect of charge in the sensitivity of GIRK5- $\Delta$ 25 to  $\text{Ba}^{2+}$  block. (A,B,C) Whole oocyte GIRK5- $\Delta$ 25, GIRK5(K157E) and GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) currents in the absence and presence of 100, 40 and 1  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$ . Currents were recorded and analyzed as indicated in Fig. 1.

$A = 0.36 \pm 0.13$  nS,  $[\text{K}^+]_o$  is in mM and 0.586 is the slope of the linear regression line. This value was close to 0.5, indicating that the conductance was approximately proportional to the square root of  $[\text{K}^+]_o$ , which is typical of an inward rectifier potassium channel [15].

### 3.4. Voltage-dependent inactivation

In general, the small decay of Kir currents before they reach the steady state has been attributed to a combination of extracellular  $\text{K}^+$  depletion, external  $\text{Na}^+$  blockade, and a voltage-dependent inactivation [15–17].

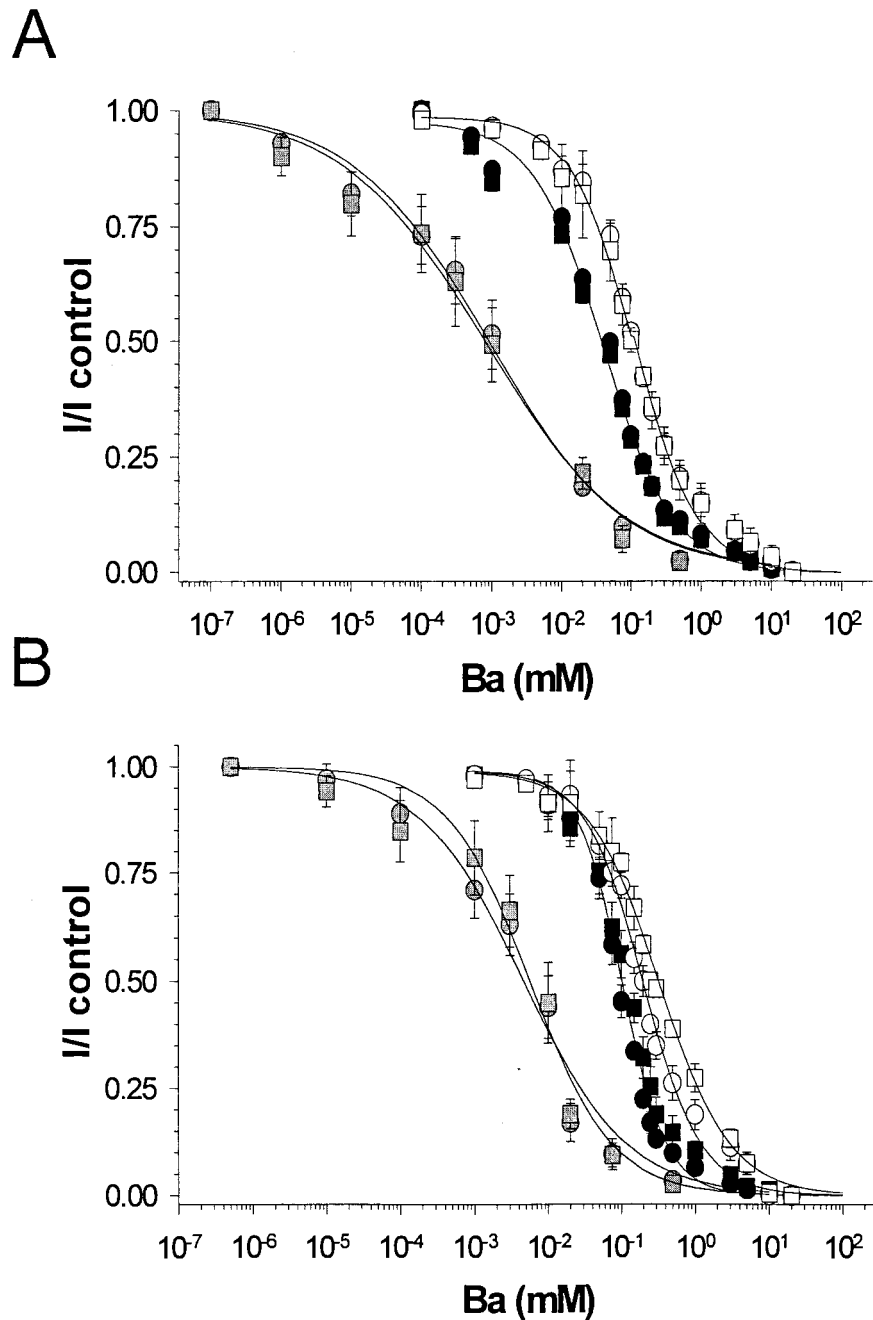


Fig. 7. Sensitivity and voltage independence of GIRK5- $\Delta$ 25 and the charge mutants GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) and GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) to  $\text{Ba}^{2+}$  block. Effect of  $\text{Ba}^{2+}$  on the instantaneous (A) and the late current at 750 ms (B) of GIRK5- $\Delta$ 25, GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) and GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) (empty, gray and filled symbols, respectively) at two voltages,  $-160$  mV (squares) and  $-80$  mV (circles). Recordings were performed in  $118$  mM of  $[\text{K}^+]_o$  at several  $\text{Ba}^{2+}$  concentrations. The pulse protocol was the same as in Fig. 1. Mean  $\pm$  S.E. values of unblocked current fraction ( $I/I_{\text{control}}$ ) were plotted at  $-160$  and  $-80$  mV ( $n=5$ ) as a function of  $\text{Ba}^{2+}$  concentration.

GIRK5- $\Delta$ 25, GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) and GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) currents showed a prominent decay at test potentials negative to  $-50$  mV even at high  $[\text{K}^+]_o$  with nominally zero  $[\text{Na}^+]_o$  (Table 1). We

studied this process with a standard inactivation protocol of two pulses shown in Fig. 4A. Prepulses to selected membrane potentials between  $-150$  and  $0$  mV from a HP of  $0$  mV were applied during  $10$  s



Table 2

Voltage dependence of GIRK5-Δ25, GIRK5-Δ25(K157E) and GIRK5-Δ25(N129E) to Ba<sup>2+</sup> blockade

	−160 mV (μM)	−80 mV (μM)
<i>I inst</i>		
GIRK5-Δ25	111.35 ± 7.13	107.62 ± 6.16
GIRK5-Δ25(K157E)	43.83 ± 3.74	39.52 ± 4.0
GIRK5-Δ25(N129E)	1.74 ± 0.77	2.01 ± 1.36
<i>I late</i>		
GIRK5-Δ25	188.45 ± 12.78	330.23 ± 26.45
GIRK5-Δ25(K157E)	95.75 ± 3.40	119.06 ± 6.01
GIRK-Δ25(N129E)	5.65 ± 1.95	7.20 ± 1.92

$K_d$  values (μM) were estimated at −160 and −80 mV for the instantaneous (*I inst*) and late currents (750 ms) from Fig. 7 (mean ± S.E.).

to allow the current to reach the steady state ( $I_{ss}$ ). The peak current elicited at the test pulse of −150 mV and after subtracting  $I_{ss}$  was normalized to the maximal current observed without prepulse ( $I/I_{max}$ ), to determine the steady-state inactivation. A sigmoidal relationship was observed, revealing the fraction of channels that was not inactivated at the different prepulse potentials (Fig. 4B). Complete inactivation was observed when prepulses were more negative than −150 mV during 10 s test pulses. These recordings were performed at high  $[K^+]_o$  without  $Na^+$ .

The recovery time course at 0 mV from the inactivation of GIRK5-Δ25 at −160 mV (Fig. 5A) was determined using a standard two-pulse protocol (upper part). The inactivating prepulse to −160 mV was followed by increasing recovery periods at 0 mV preceding the −160 mV test pulse. The instantaneous current at the onset of the test pulse was compared and normalized with the current obtained at the prepulse. These data were plotted as a function of time (Fig. 5B). The time course of the recovery at 0 mV could be fitted by a monoexponential function with a time constant of  $0.95 \pm 0.07$  s ( $n=4$ ). In other Kir channels this recovery also follows a monoexponential time course [18].

### 3.5. Sensitivity to Ba<sup>2+</sup> blockade

The high sensitivity to barium blockade is one pharmacological property of Kir channels and  $K_d$  values between 10 and 500 μM have been reported [14,19,24]. Families of GIRK5-Δ25, GIRK5-Δ25(N129E) and GIRK5-Δ25(K157E) current traces

were recorded in 118 mM of  $[K^+]_o$  at variable concentrations of external Ba<sup>2+</sup> (Fig. 6). The current amplitude at the onset and at the end of the pulse became smaller with increasing  $[Ba^{2+}]_o$  (Fig. 6). This blockade could be readily reversed by removal of Ba<sup>2+</sup> from the external solution (not shown).

In several Kir channels, Ba<sup>2+</sup> blocks the steady-state current rather than the peak current, and this blockade is a voltage-dependent process [15,20,25]. In GIRK5-Δ25 and GIRK5 mutants, Ba<sup>2+</sup> affected more importantly the instantaneous current amplitude rather than the current at the end of the pulse ('late current') (Figs. 6 and 7, Table 2).

Usually extracellular Ba<sup>2+</sup> preferentially affects Kir channels at more negative potentials. For example, the Kir2.1 potassium channel has a high Ba<sup>2+</sup> sensitivity:  $E_m = -160$  mV,  $K_d = 0.2$  μM;  $E_m = -80$  mV,  $K_d = 2.2$  μM [25]. By contrast, GIRK5-Δ25 displayed a voltage-independent Ba<sup>2+</sup> blockade:  $K_d$  values of  $111.4 \pm 7.1$  and  $107.6 \pm 6.2$  μM at −160 and −80 mV were determined, respectively. In order to explain the difference in Ba<sup>2+</sup> sensitivity between these Kir subfamilies, we focused on the electrostatic interaction between Ba<sup>2+</sup> and two amino acid residues at the external loops of GIRK5-Δ25. Therefore, we mutated to the negatively charged residue glutamate (E) the amino acids N129 and K157 for the following reasons: the negative glutamate residue (E117) in Kir2.1, present in its first loop, has a crucial role in single channel conductance and Ba<sup>2+</sup> affinity [26]. The corresponding amino acid residue in GIRK5-Δ25 is the neutral amino acid residue asparagine (N129). To study the impact of changing only the charge at the GIRK5 vestibule, we mutated the

positive amino acid residue lysine K157 in the second external loop of GIRK5- $\Delta$ 25 to glutamate (E).

Current-voltage relationships were determined in 118 mM  $K^+$  containing  $Ba^{2+}$  from 0.001 to 20 mM ( $n=5$ ; Fig. 7). The blocked fractions ( $I/I_{max}$ ) for the instantaneous and late currents were measured at all voltages. GIRK5- $\Delta$ 25 showed a  $K_d = 102 \pm 2 \mu M$  and a  $K_d = 227 \pm 9 \mu M$  for  $Ba^{2+}$  blockade at the instantaneous and late current, respectively.

We obtained a change of about two orders of magnitude in the  $K_d$  for  $Ba^{2+}$  with the GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) mutant ( $K_d = 1.8 \pm 0.5 \mu M$ ). By contrast, the GIRK5- $\Delta$ 25(K157E) mutant was only 2-fold more sensitive to  $Ba^{2+}$  blockade ( $K_d = 41.7 \pm 3.5$ ; Fig. 7, Table 2). Therefore, the amino acid residue position in the vestibule of a Kir channel is crucial in a possible electrostatic interaction with  $Ba^{2+}$ .

Table 2 shows the  $K_d$  values for instantaneous and steady-state (late) currents, confirming the voltage independence of  $Ba^{2+}$  blockade for GIRK5- $\Delta$ 25 and the charge mutant channels (Fig. 7).

#### 4. Discussion

An outstanding result of this work is that the GIRK5 gene with a shorter N-terminal end, the GIRK5- $\Delta$ 25, gives rise to functional channels, in contrast with the lack of functionality observed with the GIRK5 cRNA injected alone or with m2 and  $G\beta\gamma$  cRNAs in *X. laevis* oocytes [10]. This result is in accordance with the functionality also observed with the GIRK3.2d with a shorter N-terminal end [9].

The high basal activity of GIRK5- $\Delta$ 25 channels in the oocytes is intriguing. GIRK1/GIRK4 heteromultimers and some GIRK2 isoforms express significant basal  $K^+$  currents without receptor stimulation or G-protein activation [6,9,22]. This activity has been related to the direct action of intracellular sodium ions, requiring ATP hydrolysis. The ATP dependence of GIRK channel activity is mediated via phosphoinositol diphosphates ( $PIP_2$ ). The presence of  $PIP_2$  is essential not only for the channel gating by sodium ions but also for efficient  $G\beta\gamma$  signaling [21,22]. Since channels work efficiently even at high expression levels in the oocytes, the endogenous pool of any of these gating molecules does not appear to be a limit-

ing factor for GIRK5- $\Delta$ 25 functionality. We have also observed functional GIRK5- $\Delta$ 25 homomultimers in an insect line but GTP- $\gamma$ S is required to allow for channel activity (not shown).

Inward rectifier potassium channels display only a small inactivation [15]. The inactivation of GIRK5- $\Delta$ 25 currents had a slow time course. So far two inactivation mechanisms have been described for voltage-dependent potassium channels: a fast process referred as ‘the ball and chain’ (N-type [23]) and a slow decaying current event that strongly depends on the channel pore structure (C-type [24]). Further studies should be performed to investigate the GIRK5- $\Delta$ 25 inactivation.

$Ba^{2+}$  blockade of the GIRK5- $\Delta$ 25 instantaneous and late currents was voltage-independent (Fig. 7, Table 2), implying the existence of an external binding site. In other Kir channels, extracellular  $Ba^{2+}$  enhances dramatically the rate of current decay by entering and blocking their pores [14,16,24]. The presence of a  $Ba^{2+}$  binding site located outside the pore of the GIRK5- $\Delta$ 25 channels was tentatively confirmed by the higher affinity determined for the two charge mutants: GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) and GIRK5- $\Delta$ 25(K157E). Furthermore, the 100-fold higher sensitivity of mutant GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) for  $Ba^{2+}$  suggests that the first channel external loop contributes to the binding site for this blocker.

Important conclusions are derived from this work. First, GIRK5 channels lacking the first 25 amino acids at the N-terminal end produce functional homomultimers with an appreciable basal activity suggesting a high sensitivity of this truncated channel to the endogenous activators (i.e.  $G\beta\gamma$  proteins,  $Na^+$ , Mg-ATP and  $PIP_2$ ). Second, in contrast to other potassium channels, GIRK5- $\Delta$ 25 homomultimers present a prolonged inactivation and a voltage-independent  $Ba^{2+}$  blockade. The higher  $Ba^{2+}$  affinity of the mutant charge GIRK5- $\Delta$ 25(N129E) at the first loop of the channel vestibule supports the presence of an external  $Ba^{2+}$  site in GIRK5 channels.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Peter Ruppersberg for the PBF vector; Dr. Ana Correa and Dr. Dick Horn for their careful reading of the manuscript. We thank Monica

Salas Garcia for technical assistance. This work was supported by DGAPA IN220199 and CONACYT 30570-M grants to LE, CONACYT 30882-M and CONACYT 27692m grants to MM and GG, respectively. GG is an International Research Scholar from the Howard Hughes Medical Institute.

## References

- [1] N. Dascal, Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels, *Cell. Signal.* 9 (1997) 551–573.
- [2] G. Krapivinsky, E.A. Gordon, K. Wickman, B. Velimirovic, L. Krapivinsky, D.E. Clapham, The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel I<sub>KACH</sub> is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>+</sup> proteins, *Nature* 374 (1995) 135–141.
- [3] B.M. Velimirovic, E.A. Gordon, N.F. Lim, B. Navarro, D.E. Clapham, The K<sup>+</sup> channel inward rectifier subunits form a channel similar to neuronal G protein-gated K<sup>+</sup> channel, *FEBS Lett.* 379 (1996) 31–37.
- [4] K.W. Chan, M.N. Langan, J.L. Sui, J.A. Kozak, A. Pabon, J.A. Ladias, D.E. Logothetis, A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins, *J. Gen. Physiol.* 107 (1996) 381–397.
- [5] P. Kofuji, N. Davidson, H.A. Lester, Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> are activated by Gβγ subunits and function as heteromultimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 6542–6546.
- [6] M. Vivaudou, K.W. Chan, J.L. Sui, L.Y. Jan, E. Reuveny, D.E. Logothetis, Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of the KACH channel. Using functional homomeric mutants, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31553–31560.
- [7] F. Lesage, F. Duprat, M. Fink, E. Guillemare, T. Coppola, M. Lazdunski, J.P. Hugnot, Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain, *FEBS Lett.* 353 (1994) 37–42.
- [8] S. Isomoto, C. Kondo, N. Takahashi, S. Matsumoto, M. Yamada, T. Takumi, Y. Horio, Y. Kurachi, A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G-protein-gated K<sup>+</sup> current in *Xenopus* oocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 (1996) 286–291.
- [9] A. Inanobe, Y. Horio, A. Fujita, M. Tanemoto, H. Hibino, K. Inageda, Y. Kurachi, Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis, *J. Physiol.* 521 (1999) 19–30.
- [10] K.E. Hedin, N.F. Lim, D.E. Clapham, Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of I<sub>KACH</sub> currents in oocytes, *Neuron* 16 (1996) 423–429.
- [11] C.K. Bauer, T. Falk, J.R. Schwarz, An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 432 (1996) 812–820.
- [12] M. Martinez, C. Salvador, S.I. Mora, G. Gamba, L. Escobar, Cloning and functional characterization of a Kir3 channel from *Xenopus* oocytes, *Biophys. J.* 76 (1999) S-P241, A73.
- [13] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Diego, CA, 1989, pp. 7.19–7.22.
- [14] B. Rudy, L.E. Iverson, *Methods Enzymol.* 207 (1992) 266–279; 270–274.
- [15] S. Hagiwara, S. Miyasaki, P. Rothenthal, 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 (1976) 621–638.
- [16] B. Sakman, G. Trube, Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane, *J. Physiol.* 347 (1984) 641–657.
- [17] N.B. Standen, P.R. Stanfield, A potential and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions, *J. Physiol.* 280 (1978) 169–191.
- [18] R.D. Harvey, R.E. Ten Eick, Characterization of the inward-rectifying potassium current in cat ventricular myocytes, *J. Gen. Physiol.* 91 (1988) 593–615.
- [19] S. Hagiwara, S. Miyasaki, W. Moody, J. Patlak, Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg, *J. Physiol.* 279 (1978) 167–185.
- [20] Y. Kubo, T.J. Baldwin, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel, *Nature* 362 (1993) 127–132.
- [21] C. Huang, S. Feng, D.W. Hilgemann, Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gβγ, *Nature* 391 (1998) 803–806.
- [22] J.L. Sui, K.W. Chan, D.E. Logothetis, Na<sup>+</sup> Activation of the muscarinic K<sup>+</sup> channel by a G-protein-independent mechanism, *J. Gen. Physiol.* 108 (1996) 381–391.
- [23] T. Hoshi, W.N. Zagotta, R.W. Aldrich, Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region, *Neuron* 7 (1991) 547–556.
- [24] J. Lopez-Barneo, T. Hoshi, S.H. Heinemann, R.W. Aldrich, Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels, *Recept. Channels* 1 (1993) 61–71.
- [25] R. Shieh, J. Chang, J. Arreola, Interaction of Ba<sup>2+</sup> with the pores of the cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes, *Biophys. J.* 75 (1998) 2313–2322.
- [26] D.S. Navaratnam, L. Escobar, M. Covarrubias, J.C. Oberholtzer, Permeation properties and differential expression across the auditory receptor epithelium of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel cloned from the chick inner ear, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19238–19245.

# Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers

S. Ivonne Mora, Laura I. Escobar\*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF*

Received 22 April 2005; accepted 22 April 2005

Available online 5 May 2005

Edited by Maurice Montal

**Abstract** The G protein-coupled inwardly rectifying GIRK5 and  $\Delta$ 5GIRK5 splicing variants do not express functional potassium channels. In contrast,  $\Delta$ 25GIRK5 forms functional homomultimers in *Xenopus laevis* oocytes. A tyrosine is present at the N-term of the non-functional isoforms. We studied the effect of endogenous tyrosine phosphorylation on the GIRK5 surface and functional expression. Unlike wild type channels, GIRK5Y16A and  $\Delta$ 5GIRK5Y16A mutants displayed inwardly rectifying currents and inhibitors of Src tyrosine kinase promoted the trafficking of GIRK5 to the cell surface. This is the first evidence that endogenous phosphorylation of a tyrosine residue in a GIRK channel inhibits its surface expression.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** G-protein-activated inwardly rectifying potassium channel; GIRK; Kir3; Tyrosine phosphorylation; Src; Genistein; Geldanamycin; Trafficking; Oocyte

## 1. Introduction

Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels activated by Gi/Go protein-coupled receptors (GIRK or Kir 3.x) decrease membrane excitability by hyperpolarizing the membrane potential, slowing membrane depolarization, and shortening the action potential waveform [1]. These tightly regulated K<sup>+</sup> channels are functionally expressed in the heart [2], the central nervous system [3] and the smooth muscle [4]. The molecular mechanisms underlying G protein regulation of GIRK channels have been extensively studied in the acetylcholine activated GIRK1/GIRK4 heteromultimer ( $I_{KACH}$ ) from atrial pacemaker cells and myocytes [5–7]. Experimental evidence shows that functional expression of GIRK channels requires homo or heterotetramerization [1,7–12]. Four GIRK members have been identified so far in mammalian species: GIRK1 through GIRK4 [12–15].

In contrast to the widely characterized GIRKs from mammals, few functional studies exist of these channels in non-excitable cells where G-protein coupled receptors play a crucial role in cell development and differentiation.

Oocytes have been an important model system for studying cell cycle regulation and the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins [16]. GIRK5 (Kir3.5)

was identified in *Xenopus laevis* oocytes and shows a longer NH2 end compared with their mammals homologues [17]. The splicing variants of GIRK5 comprise three isoforms: GIRK5,  $\Delta$ 5GIRK5 and  $\Delta$ 25GIRK5 (Fig. 1A).  $\Delta$ 25GIRK5 gives rise to functional channels with an outstanding basal activity (non-receptor coupled) in oocytes [18] and insect cells [19]. Intriguingly, the isoforms GIRK5 and  $\Delta$ 5GIRK5 are not functional. These isoforms present a tyrosine (Y16) within a consensus phosphorylation site at their N-terminus (Fig. 1A) [20].

Ion channel phosphorylation plays an important role in the modulation of membrane excitability by altering the gating and ion permeation of ligand-gated receptors and voltage-gated calcium, sodium and potassium channels [21]. The activity of some potassium channels such as the inward rectifier Kir 2.1 [22,23], the voltage-gated Kv1.2 [24], Kv1.3 [25–27], Kv1.5 [28], Kv7.3, Kv7.4, Kv7.5 [29,30], and the hyperpolarization-activated HCN channels [31] is suppressed by tyrosine phosphorylation.

The aim of this work was to study the effect of endogenous phosphorylation of tyrosine 16 on the functional expression of GIRK5 channels in the oocytes.

Our study provides the first evidence that endogenous phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus of a GIRK channel regulates its trafficking to the surface and, then, its functional expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. DNA clones, mutagenesis and fusion proteins

The open reading frames (ORF) of GIRK5 (U42207),  $\Delta$ 5GIRK5 and  $\Delta$ 25GIRK5 cDNAs were obtained by PCR as in previous studies [18,19]. Site-specific mutagenesis of tyrosine 16 to an alanine residue (GIRK5Y16A and  $\Delta$ 5GIRK5Y16A) was introduced by the polymerase chain reaction using the mutant primers: (a) 5' AAA GAT TGG CTG AGT CAC C 3' (sense) and (b) 5' GGT GAC TCA GCC AAT CTT T 3' (antisense). The SP6 (sense) and 5' AGA GAC CAA AAAGAG ACG ATC GTCGCC TGT ATC AAA 3' (antisense) were used as flanking primers. Constructs encoding EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A and EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 fusion proteins were made by adding the ORF of the enhanced green fluorescent protein (pEGFP-C1; Clontech) at the N-terminal. All GIRK5 cDNAs were subcloned in the pRSP6013A3-UWE vector (pBF) and sequenced [18,19].

### 2.2. cRNA synthesis and injection of oocytes

G $\alpha$ i2, m2ACh receptor and all GIRK5 cRNAs were synthesized from linearized plasmid vectors using the mMessage mMachine kit (Ambion Corporation, Austin, TX). *Xenopus laevis* oocytes stage V and VI were obtained as described in [26]. Control oocytes were injected with water. 5–20 ng of all GIRK5 cRNAs was injected in the oocytes. The cells were maintained in a ND96 solution as described in [18].

\*Corresponding author. Fax: +52 55 56 23 22 41.

E-mail address: laurae@servidor.unam.mx (L.I. Escobar).

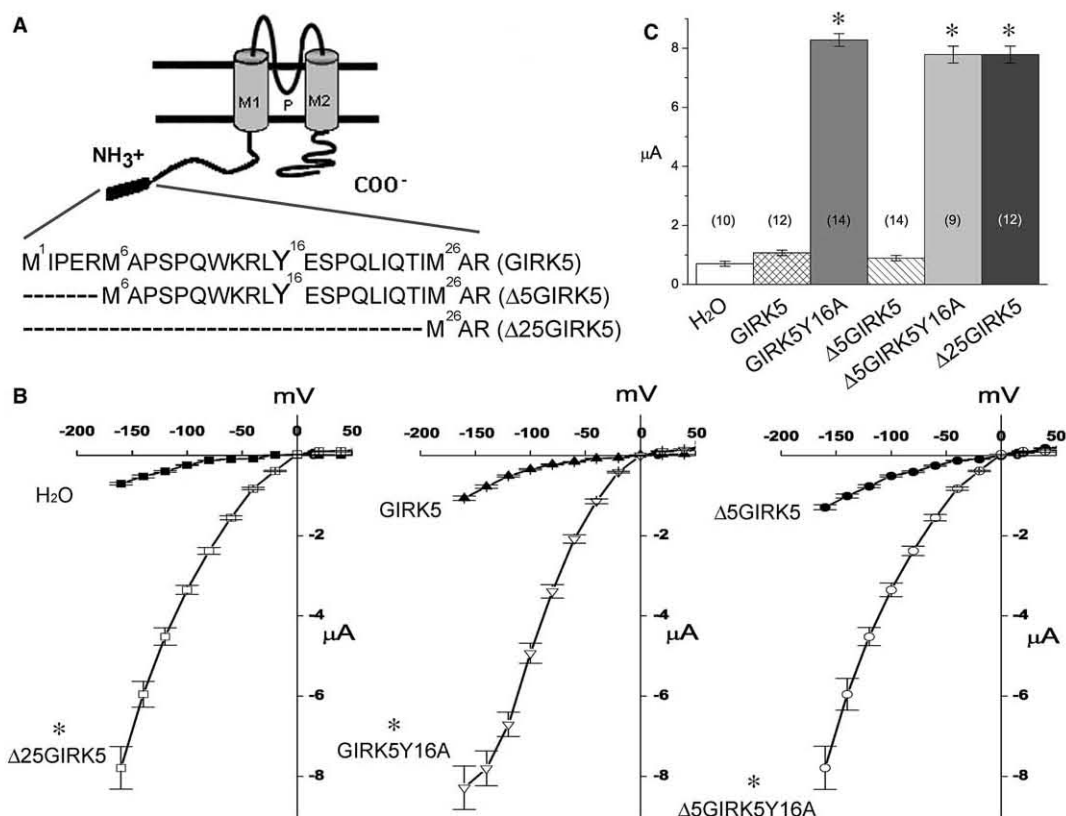


Fig. 1. Basal activities of GIRK5 channels. (A) A tyrosine (Y16) 16 is present in the first 25 amino acids residues of GIRK5 and Δ5GIRK5. (B) Current/voltage (*I/V*) relationships for GIRK5, GIRK5Y16A, Δ5GIRK5, Δ5GIRK5Y16A and Δ25GIRK5 obtained by TEVC. (C) Normalized currents registered at  $-160$  mV.

### 2.3. Electrophysiological procedures

Oocytes were registered with the two-electrode voltage clamp (TEVC) technique 2–4 days after injected as described [26]. Voltage pulse protocols were performed using consecutive 100 ms step changes from  $-160$  to  $+60$  mV with increments of 20 mV. Oocytes were clamped at a holding potential of 0 mV.  $10 \mu\text{M}$  carbachol (carbamylcholine chloride, Sigma) was used to activate the m2 muscarinic receptor (m2ACh). TEVC was performed using the amplifier Geneclamp 500, a Digidata 1322A interface with pClamp8 software (Axon Instruments). Analysis was performed with the pClamp8 software and Origin v. 5.0 (Microcal). Data were sampled at 5–10 kHz and filtered at 1–5 kHz. The mean standard deviation from a number (*n*) of independent experimental observations is shown. ANOVA and *t*-student tests were used to compare significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 2.4. Confocal microscopy

Oocytes injected with the EGFP-GIRK5, EGFP-GIRK5Y16A and EGFP-Δ25GIRK5 cRNAs were examined four days after their injection. EGFP fluorescence was excited at 488 nm with an argon laser beam and viewed with a Nikon TMD 300 inverted microscope equipped with a  $10\times$  dry lens. Fluorescent emissions of 520 nm were collected using a long pass filter. XY scans were obtained at approximately the midsection of each egg. Six sections of an oocyte membrane were recorded and the signal averaged for each cell.

### 2.5. Protein tyrosine kinase inhibitors assays

Genistein and geldanamycin (Alomone labs, Israel) were dissolved in dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO; Baker) and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The final concentration of Me<sub>2</sub>SO applied to the oocytes was less than 0.02%. Control oocytes and those injected with GIRK5, GIRK5Y16A, Δ25GIRK5 and EGFP-GIRK5 cRNAs, were incubated with the inhibitors by 1 h. TEVC recordings of oocytes were then performed.

### 2.6. Western blotting

The membrane fraction of oocytes injected with the EGFP-GIRK5 cRNA was obtained according to [32]. The pellet was rinsed in  $20 \mu\text{l}$  of sample buffer and loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gel as described in [33], and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P, Amersham Life Science). Pre-stained molecular mass markers were purchased from Amersham Life Science. A monoclonal antibody against EGFP was used for immunodetection (Clontech, Palo Alto, CA). The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham Life Science). Antigen-antibody complexes were detected by autoradiography-enhanced chemiluminescence (ECL Advance, Amersham Life Science).

## 3. Results

Expression of recombinant Δ25GIRK5 displayed a basal activity of  $7.02 \pm 0.2 \mu\text{A}$  while GIRK5 and Δ5GIRK5 did not show significant differences with control oocytes:  $1.4 \pm 0.2$ ,  $1.7 \pm 0.2$  and  $1.6 \pm 0.3 \mu\text{A}$  at  $-160$  mV, respectively (Fig. 1B and C). There is a tyrosine within a putative consensus site for phosphorylation at the NH<sub>2</sub>-end of GIRK5 and Δ5GIRK5 (Fig. 1A; 28). In order to investigate if this tyrosine has a role in controlling the activity of these GIRK5 isoforms, mutants GIRK5Y16A and Δ5GIRK5Y16A were tested. Both mutants produced inwardly rectifying currents: GIRK5Y16A,  $8.5 \pm 0.2 \mu\text{A}$  and Δ5GIRK5Y16A,  $8 \pm 0.4 \mu\text{A}$  at  $-160$  mV (Fig. 1B and C). Therefore, these results reveal that Y16, either if it is or not phosphorylated controls the activity of GIRK5 and Δ5GIRK5.

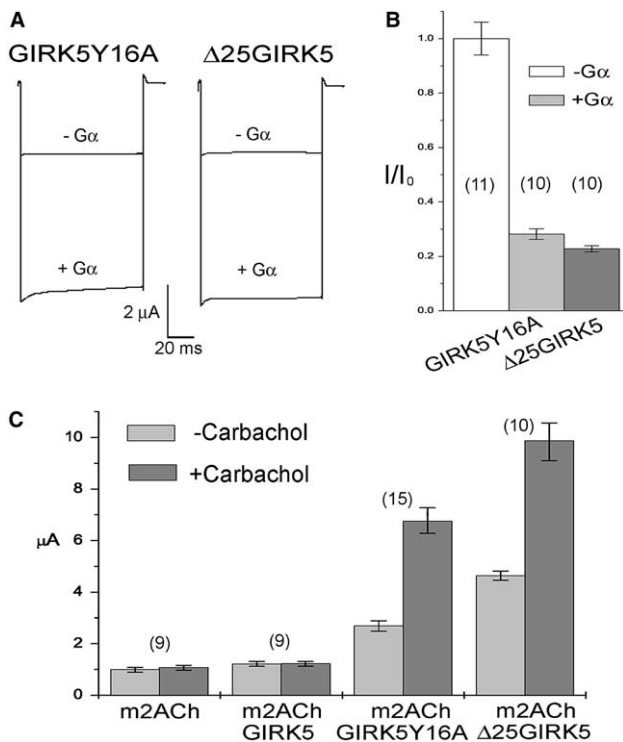


Fig. 2. Activation by endogenous  $G\beta\gamma$  proteins. (A) GIRK5Y16A and  $\Delta 25$ GIRK5 inwardly currents in oocytes overexpressing  $G\alpha i2$ . (B) Normalized currents ( $I/I_0$ ). (C) The m2ACh cRNA was coinjected with GIRK5,  $\Delta 25$ GIRK5 or the GIRK5Y16A cRNAs. Basal (–carbachol) and receptor-dependent (+carbachol) activity.

Opening of GIRK channels can happen by direct binding of  $G\beta\gamma$  subunits released from the  $G\alpha i/o\beta\gamma$  heterotrimeric [1,2,9]. In order to test whether or not the basal activities of GIRK5Y16A and  $\Delta 25$ GIRK5 result from their activation by endogenous membrane-bound  $G\beta\gamma$ s, coexpression of  $G\alpha i2$  was performed. As predicted, both channels were inhibited (75%) as a result of overexpressing  $G\alpha i2$  (Fig. 2A and B).

To estimate if the overall expressed channels were activated by endogenous  $G\beta\gamma$ s, we studied their activation by recombinant m2ACh. Carbachol caused an increment of more than two times with respect to the basal activity of both GIRK5Y16A and  $\Delta 25$ GIRK5. In contrast, activation of m2ACh had no effect on GIRK5 functional expression (Fig. 2C).

To further correlate channel inhibition with loss of surface expression, we proceed to determine the presence of GIRK5 channels at the plasma membrane. Then, we tagged the channels with the EGFP to study their surface expression by laser-scanning confocal microscopy. Control oocytes and those injected with EGFP-GIRK5 cRNA did not show any fluorescence, whereas EGFP-GIRK5Y16A and EGFP- $\Delta 25$ GIRK5 both appeared at the cell surface (Fig. 3B). Furthermore, these constructs also displayed basal activity: EGFP-GIRK5Y16A,  $6.38 \pm 1.85 \mu A$  ( $n = 11$ ) and EGFP- $\Delta 25$ GIRK5,  $5.22 \pm 1.05 \mu A$  ( $n = 11$ ) at  $-160$  mV (Fig. 3C). Therefore, Y16 controls the surface trafficking of GIRK5 channels to the plasma membrane.

Since endogenous Src-like tyrosine kinase activity has been determined in *Xenopus laevis* oocytes [34], we studied the effect of two tyrosine kinase (PTK) inhibitors. Oocytes injected with GIRK5, GIRK5Y16A and  $\Delta 25$ GIRK5 cRNAs were

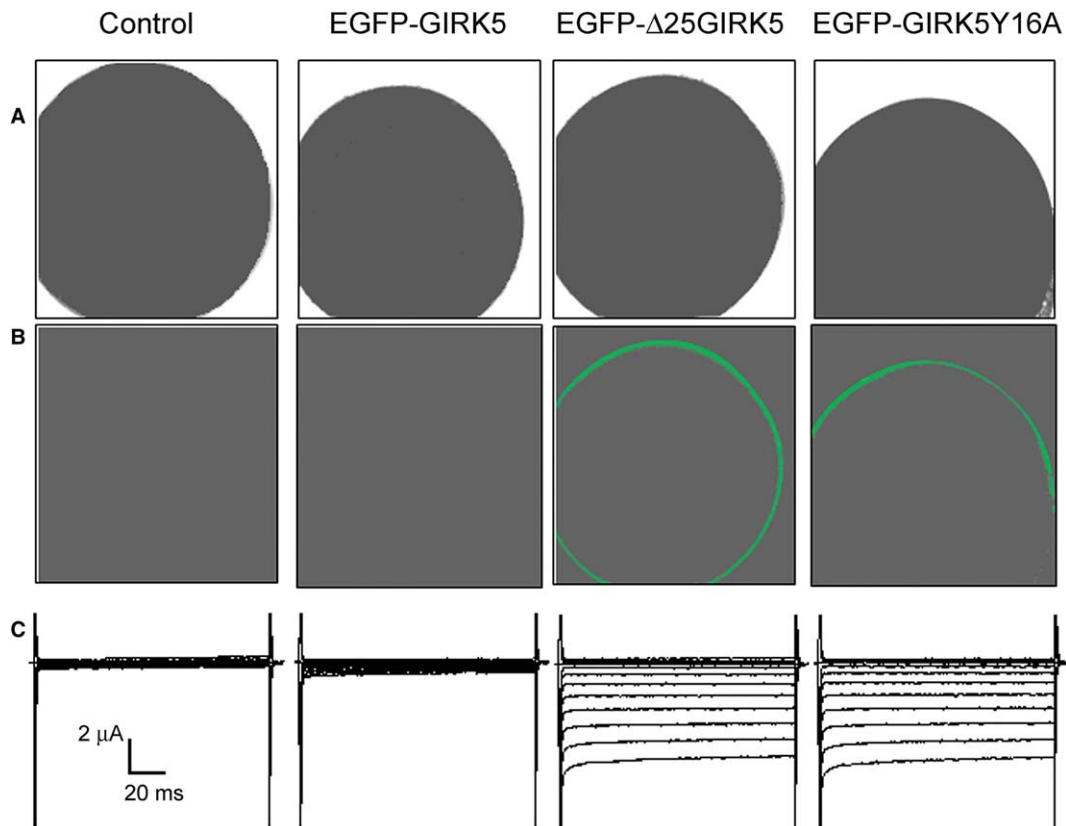


Fig. 3. Surface and functional expression of EGFP-GIRK5, EGFP- $\Delta 25$ GIRK5 and EGFP-GIRK5Y16A channels. (A) Optic and (B) confocal microscopy images. (C) Recordings by TEVC. EGFP-GIRK5Y16A,  $6.4 \pm 1.9 \mu A$  and EGFP- $\Delta 25$ GIRK5,  $5.2 \pm 1.0 \mu A$ , at  $-160$  mV;  $n = 11$ .

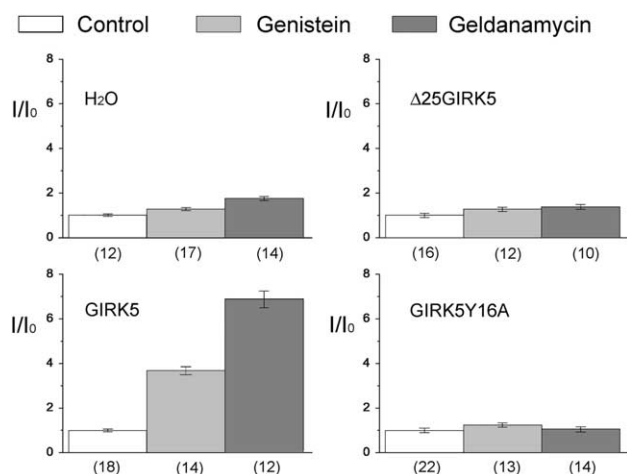


Fig. 4. Effect of PTKs inhibitors on the basal activity of GIRK5 channels. Control oocytes and those injected with GIRK5, GIRK5Y16A and  $\Delta$ 25GIRK5 cRNAs were incubated with genistein (20  $\mu$ M) or geldanamycin (75 nM) by one hour in ND96, before currents were recorded. Normalized currents ( $-160$  mV).

incubated with 20  $\mu$ M genistein or 75 nM geldanamycin by one hour. Both inhibitors did not produce significant changes in the basal activities of GIRK5Y16A and  $\Delta$ 25GIRK5 (Fig. 4). Importantly, basal activity of GIRK5 was recorded for the first time:  $2.6 \pm 0.3$   $\mu$ A with genistein and  $4.8 \pm 0.6$   $\mu$ A with geldanamycin (Fig. 4). These results strongly suggest that PTKs inhibitors allow the dephosphorylation of GIRK5 at Y16 by endogenous phosphatases in the oocytes [22].

Finally, to further confirm that endogenous phosphorylation of tyrosine 16 inhibits the surface expression of GIRK5 two approaches were followed. First, oocytes injected with EGFP-GIRK5 cRNA were incubated without and with geldanamycin by one hour. Only the oocytes incubated with the PTK inhibitor showed fluorescence (Fig. 5B) and also displayed inward currents of  $2.8 \pm 0.4$   $\mu$ A at  $-160$  mV (Fig. 5C). Second, a Western blot analysis was performed with the above oocytes. EGFP-GIRK5 appeared in the membrane fraction exclusively in the oocytes incubated with geldanamycin. The protein level of EGFP-GIRK5 was similar to the isoform EGFP- $\Delta$ 25GIRK5 and the mutant EGFP-GIRK5Y16A (Fig. 5D). These results strongly suggest that basal phosphorylation of Y16 in GIRK5 inhibits its trafficking to the plasma membrane.

#### 4. Discussion

To explain the lack of functionality of the wild type GIRK5, we studied the role of endogenous tyrosine phosphorylation in oocytes overexpressing this channel. Our findings show that phosphorylation of tyrosine 16 at the N-terminus of GIRK5 avoids its trafficking to the surface and, as a consequence, its functional expression. Several studies have demonstrated that tyrosine phosphorylation by Src can modulate channel activity. For example, the NMDA channel currents are increased [36] whereas Kv1.3 and Kv1.5 currents are suppressed [25,28,37]. An endogenous Src is also involved in regulating the number of apical small conductance K<sup>+</sup> channels in the cortical collecting ducts in kidneys from rats on a K-deficient

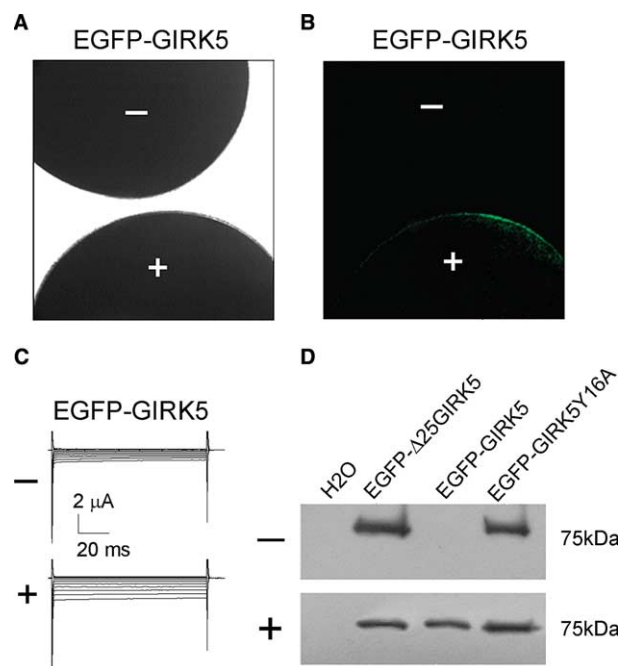


Fig. 5. Geldanamycin promotes the surface and functional expression of EGFP-GIRK5. Oocytes were incubated one hour without (–) and with (+) 75 nM geldanamycin in ND96. Oocytes were analyzed with (A) optic and (B) confocal microscopy. (C) Functional expression was determined by TEVC. (D) Western blot analysis of GIRK5 proteins.

diet [22]. In ROMK1 (Kir2.1) channels, Src mediated phosphorylation of tyrosine 337 at the carboxy terminus induces their internalization in oocytes [35].

Activation of a tyrosin kinase receptor by a neurotrophic factor accelerates GIRK1 and GIRK4 deactivation [38]. However, inhibition of these channels happens by the presence of an intrinsic GTPase-activating protein domain that it is unmasked by phosphorylation of two tyrosine residues [39].

In conclusion, phosphorylation of GIRK5 by endogenous PTKs regulates its surface trafficking. GIRK5 may have a contribution in establishing the resting membrane potential in oocytes. Further studies should be performed to identify and determine the molecular interactions of the endogenous PTKs that modulates GIRK5 surface expression in these cells. Understanding the basis for the modulation of GIRKs by tyrosine phosphorylation will provide additional insight into the processes regulating the activity of these physiologically significant channels.

*Acknowledgments:* We are grateful to the colleagues who kindly provided the cDNA clones: Paul Slesinger (m2AChR) and Eitan Reuveny (G $\alpha$ i2). Gerardo Gamba, Ruth Murrell-Lagnado and Alejandro Zentella for their helpful discussions. We thank Patricia Meade, Anahí Paredes and Carolina Salvador for their technical assistance. This work was supported by grants of CONACYT (30570 and 41365) and DGAPA (IN220199). Ivonne Mora was supported with PhD fellowships from CONACYT 144127, PDCB and DGEP from UNAM.

#### References

- [1] Yamada, M., Inanobe, A. and Kurachi, Y. (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol. Rev.* 50, 723–760.

- [2] Kurachi, Y., Tung, R.T., Ito, H. and Nakajima, T. (1992) G protein activation of cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channels. *Prog. Neurobiol.* 3, 229–246.
- [3] Lesage, F., Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M. and Hugnot, J.P. (1994) Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain. *FEBS Lett.* 353, 37–42.
- [4] Bradley, K.K., Hatton, W.J., Mason, H.S., Walker, R.L., Flynn, E.R., Kenyon, J.L. and Horowitz, B. (2000) Kir3.1/3.2 encodes an I(KACh)-like current in gastrointestinal myocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, 289–296.
- [5] Soejima, M. and Noma, A. (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflugers Arch.* 400, 424–431.
- [6] Wickman, K.D., Iniguez-Lluhl, J.A., Davenport, P.A., Taussig, R., Krapivinsky, G.B., Linder, M.E., Gilman, A.G. and Clapham, D.E. (1994) Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* 368, 255–257.
- [7] Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins. *Nature* 374, 135–141.
- [8] Spauschus, A., Lentjes, K.U., Wischmeyer, E., Dissmann, E., Karschin, C. and Karschin, A. (1996) A G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *J. Neurosci.* 16, 930–938.
- [9] Dascal, N. (1997) Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal* 9, 551–573.
- [10] Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (1998) Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* 273, 5271–5278.
- [11] Wickman, K., Karschin, C., Karschin, A., Picciotto, M. and Clapham, D. (2000) Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K<sup>+</sup> channel subunit GIRK4. *J. Neurosci.* 20, 5608–5715.
- [12] Bender, K., Wellner-Kienitz, M., Inanobe, A., Meyer, T., Kurachi, Y. and Pott, L. (2001) Overexpression of monomeric and multimeric GIRK4 subunits in rat atrial myocytes removes fast desensitization and reduces inward rectification of muscarinic K(+) current (I(KACh)). Evidence for functional homomeric GIRK4 channels. *J. Biol. Chem.* 276, 28873–28880.
- [13] Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 364, 802–806.
- [14] Chan, K.W., Langan, M.N., Sui, J.L., Kozak, J.A., Pabon, A., Ladias, J.A.A. and Logothetis, D.E. (1996) A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J. Gen. Physiol.* 107, 381–397.
- [15] Iizuka, M., Kubo, Y., Tsunenari, I., Pan, C.X., Akiba, I. and Kono, T. (1995) Functional characterization and localization of a cardiac-type inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel. *Receptors Channels* 3, 299–315.
- [16] Nebreda, A.R. and Ferby, I. (2000) Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 666–675.
- [17] Hedin, K.E., Lim, N.F. and Clapham, D.E. (1996) Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of IKACH currents in oocytes. *Neuron* 16, 423–429.
- [18] Salvador, C., Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Fariás, J.M., Gamba, G. and Escobar, L.I. (2001) Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 135–147.
- [19] Salvador, C., Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. and Escobar, L.I. (2003) Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sci.* 72, 1509–1518.
- [20] Schmitz, R., Baumann, G. and Gram, H. (1996) Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J. Mol. Biol.* 260, 664–677.
- [21] Davis, M.J., Wu, X., Nurkiewicz, T.R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M.A. and Wilson, E. (2001) Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 281, 1835–1862.
- [22] Wang, W., Lerea, K.M., Chan, M. and Giebisch, G. (2000) Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am. J. Physiol.* 278, 165–171.
- [23] Tong, Y., Brandt, G.S., Li, M., Shapovalov, G., Slimko, E., Karschin, A., Dougherty, D.A. and Lester, H.A. (2001) Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 117, 103–118.
- [24] Huang, X.Y., Morielli, A.D. and Peralta, E.G. (1993) Tyrosine kinase-dependent suppression of a potassium channel by the G protein-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *Cell* 75, 1145–1156.
- [25] Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R. and Levitan, I.B. (1996) Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* 274, 2089–2091.
- [26] Szabó, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A.E., Schlottmann, K., Pongs, O. and Lang, F. (1996) Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* 271, 20465–20469.
- [27] Holmes, T.C., Fadool, D.A. and Levitan, I.B. (1996) Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J. Neurosci.* 16, 1581–1590.
- [28] Fadool, D.A., Holmes, T.C., Berman, K., Dagan, D. and Levitan, I.B. (1997) Tyrosine phosphorylation modulates current amplitude and kinetics of a neuronal voltage-gated potassium channel. *J. Neurophysiol.* 78, 1563–1573.
- [29] Gamper, N., Stockand, J.D. and Shapiro, M.S. (2003) Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J. Neurosci.* 23, 84–95.
- [30] Li, Y., Langlais, P., Gamper, N., Liu, F. and Shapiro, M.S. (2004) Dual phosphorylations underlie modulation of unitary KCNQ K(+) channels by Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 45399–45407.
- [31] Yu, H., Lu, Z., Pan, Z. and Cohen, I.S. (2004) Tyrosine kinase inhibition differentially regulates heterologously expressed HCN channels. *Pflugers Arch.* 447, 392–400.
- [32] Hoover, R.S., Poch, E., Monroy, A., Vazquez, N., Nishio, T., Gamba, G. and Hebert, S.C. (2003) N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na(+):Cl(-) cotransporter. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 271–282.
- [33] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- [34] Sato, K., Aoto, M., Mori, K., Akasofu, S., Tokmakov, A.A., Sahara, S. and Fukami, Y. (1996) Purification and characterization of a Src-related p57 protein-tyrosine kinase from *Xenopus oocytes*. Isolation of an inactive form of the enzyme and its activation and translocation upon fertilization. *J. Biol. Chem.* 271, 13250–13257.
- [35] Moral, Z., Dong, K., Wei, Y., Sterling, H., Deng, H., Ali, S., Gu, R., Huang, X.Y., Hebert, S.C., Giebisch, G. and Wang, W.H. (2001) Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 276, 7156–7163.
- [36] Yu, X., Askalan, R., Keil II, G.J. and Salter, M.W. (1997) NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* 275, 674–678.
- [37] Nitabach, M.N., Llamas, D.A., Thompson, I.J., Collins, K.A. and Holmes, T.C. (2002) Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation of shaker family voltage-gated potassium channels by SRC family protein tyrosine kinases. *J. Neurosci.* 22, 7913–7922.
- [38] Rogalski, S.L., Appleyard, S.M., Pattillo, A., Terman, G.W. and Chavkin, C. (2000) TrkB activation by brain-derived neurotrophic factor inhibits the G protein-gated inward rectifier Kir3 by tyrosine phosphorylation of the channel. *J. Biol. Chem.* 275, 25082–25088.
- [39] Ippolito, D.L., Temkin, P.A., Rogalski, S.L. and Chavkin, C. (2002) N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *J. Biol. Chem.* 277, 32692–32696.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Life Sciences 72 (2003) 1509–1518

Life Sciences

[www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)

## Basal activity of GIRK5 isoforms

Carolina Salvador<sup>a</sup>, Silvia I. Mora<sup>a</sup>, Benito Ordaz<sup>b</sup>, Anaid Antaramian<sup>b</sup>,  
Luis Vaca<sup>b</sup>, Laura I. Escobar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado Postal 70-250, D.F., 04510, Mexico

<sup>b</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Received 9 May 2002; accepted 15 October 2002

### Abstract

G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRK or Kir3) form functional heterotetramers gated by Gβγ subunits. GIRK channels are critical for functions as diverse as heart rate modulation and neuronal post-synaptic inhibition. GIRK5 (Kir3.5) is the oocyte homologue of the mammalian GIRK subunits that conform the K<sub>ACh</sub> channel. It has been claimed that even when the oocytes express GIRK5 proteins they do not form functional channels. However, the GIRK5 gene shows three initiation sites that suggest the existence of three isoforms. In a previous work we demonstrated the functionality of homomultimers of the shortest isoform overexpressed in the own oocytes. Remarkably, the basal GIRK5-Δ25 inward currents were not coupled to the activation of a G-protein receptor in the oocytes. These results encouraged us to study this channel in another expression system. In this work we show that Sf21 insect cells can be successfully transfected with this channel. GIRK5-Δ25 homomultimers produce time-dependent inward currents only with GTPγS in the recording pipette. Therefore, alternative modes of stimulus input to heterotrimeric G-proteins should be present in the oocytes to account for these results.

© 2002 Published by Elsevier Science Inc.

*Keywords:* GIRK, Kir3; Inward rectifying potassium channel; *Xenopus* oocytes; Insect cells; G-protein; Isoforms

### Introduction

Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels activated by G protein-coupled receptors decrease membrane excitability by hyperpolarizing the membrane potential, slowing membrane depolarization, and

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-6-23-23-66; fax: +52-5-6-23-22-41.

E-mail address: [laurae@servidor.unam.mx](mailto:laurae@servidor.unam.mx) (L.I. Escobar).

shortening the action potential waveform [1]. These tightly regulated  $K^+$  channels are functionally expressed in the heart [2] and in the central nervous system [3]. The molecular mechanisms underlying G protein regulation of GIRK channels have been most extensively studied in the cardiac muscarinic  $K^+$  channel, the acetylcholine (ACh)-activated GIRK channel ( $I_{KACH}$ ) in atrial pacemaker cells and myocytes [4–6].  $I_{KACH}$  is composed of GIRK1 and GIRK4 subunits. Abundant experimental evidence shows that the functional expression of GIRK channels requires heterotetramerization [1].

Five members of the GIRK group (GIRK1 through 5) have been identified so far. GIRK1 through GIRK4 have been cloned only from mammalian species [7–9] while GIRK5 has been cloned from *Xenopus laevis* oocytes [10,11]. GIRK5 shows 78% amino acid homology with GIRK4 [10]. Consistent with the idea that functional GIRK channels are heterotetramers, oocytes overexpressing GIRK5 in the absence of GIRK1 do not display ACh-stimulated currents [10].

The genomic sequence of GIRK5 shows three possible translation initiation sites (methionine 1, 5 and 25) according to the Kozak consensus sequences [12]. Previously, we cloned and showed the functionality of the shortest isoform in the oocytes [11].

In this work, specific primers were designed to isolate the cDNA coding for the other GIRK5 isoforms. We found that GIRK5 and GIRK5- $\Delta 5$  did not express functional channels in contrast to GIRK5- $\Delta 25$  in the oocytes. To further characterize the functional properties of the endogenous oocyte GIRK5- $\Delta 25$  isoform, we transfected this channel in the recombinant insect cell baculovirus expression system [13].

The results presented here confirm that GIRK5- $\Delta 25$  also produces stable, G-protein-activated homomultimers in insect cells. A possible role of the first 25 amino acids in the functional association of GIRK5 homotetramers is discussed.

## Methods

The GIRK5 and GIRK5- $\Delta 25$  isoforms were obtained as described in [11]. The GIRK5- $\Delta 5$  was amplified by PCR with the primers 5'-AAG AGT CGA CAT GGC ACC AAG TCC TCA GTG-3' (sense) and 5'-AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTC GCC TGT ATC AAA-3' (antisense). The fragment amplified was processed like GIRK5 [11]. 25 ng of GIRK5, GIRK5- $\Delta 5$  and GIRK5- $\Delta 25$  cRNA transcribed in vitro (RNA polymerase SP6, transcription kit, Ambion) were injected into oocytes previously defolliculated for electrophysiological assays. The full-length cDNA encoding GIRK5- $\Delta 25$  was subcloned into the pBlueBac4 vector at Xho I- Sal I sites (Invitrogen). Restriction mapping and sequence analysis confirmed the orientation of the cDNA. The recombinant baculovirus was produced following the manufacturer instructions (Invitrogen). The baculovirus was purified twice using the plaque assay and amplified. The titer of the recombinant virus was determined following the expression of  $\beta$ -galactosidase [13]. The final virus stock was maintained at 4 °C until use.

The insect Sf21 cell line (Invitrogen) from the armyworm caterpillar *Spodoptera frugiperda*, was kept in a monolayer culture at 27 °C in Grace's media (GIBCO). Cells were propagated every 3–4 days. The cells were infected with recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis (AcNPV) baculovirus containing the full-length cDNA for GIRK5- $\Delta 25$ . The cells were infected in 35 mm plates at a MOI of 5 and kept at 27 °C after infection. Cells were used 2 days later for recordings. Experiments were carried out at room temperature (20–25 °C).

### PCR assays

Sf21 cells were grown on 100 mm plastic tissue-culture dishes (Corning). Cells were infected either with GIRK5- $\Delta$ 25 or bradykinin receptor (Bk2) recombinant baculoviruses. Total RNA was obtained from non-infected and infected cells with the trizol reagent (Life Technologies). Several RT-PCR experiments were performed (M-MLV reverse transcriptase, GIBCO). 5  $\mu$ g of total RNA from oocytes, rat brain, kidney and insect cells were used to obtain their cDNAs. 10 ng cDNA of these samples and plasmids containing the channels GIRK5- $\Delta$ 25, GIRK4 and GIRK1, respectively, were amplified with primers (GIBCO) designed for conserved GIRK subfamily regions. Pore H5 (160–172 amino acids in GIRK5): 5'G TCT GCA TTT CTT TTT TCT ATT GAA ACT GAG ACT ACA ATT G 3' (sense) and at the C-terminal (283–294 amino acids in GIRK5): 5'AGA GAC CAA AAA GAG ACG ATC GTC GCC TGT ATC AAA G 3' (antisense). Meanwhile the H5 amino acids among GIRKs are 92% (GIRK1) and 100% (the other GIRKs) homologous, the C-terminal primer displays 92% (GIRK4), 100% (GIRK3), 83% (GIRK2) and 75% (GIRK1) amino acid homology. We expect a 432 bp fragment. 5  $\mu$ l of the PCR samples were run in a 1% agarose gel in TBE buffer. Specific primers for GIRK1 were also designed: 5'CAT CGT CGA CAT GTC TGC ACT CCG AAG GAA ATT TGG G 3' (sense) and 5'GAT GGT GGC CTC GGT CTC GAT GAA GAA AAG GAA GGC 3' (antisense).

### Electrophysiology

Oocytes 3–4 days after cRNA injection were recorded using two-electrode voltage clamp technique (AxoClamp 2B, Axon Instruments). Whole-oocyte recordings were filtered at 4 kHz, and stored on the computer hard disk for off-line analysis with pCLAMP v. 6.4 (Axon Instruments) and Origin v. 5.0 (Microcal). Electrodes showed resistances of 0.5–1 M $\Omega$  (3 M KCl). The bath solution contained (in mM): KCl 118, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1 and HEPES 5 at pH7.4. Oocytes were voltage clamped at –0 mV and voltage pulses from –160 to 60 mV for 100 ms with increments of 20 mV were applied to elicit currents. Currents in Sf21 cells were measured by whole-cell patch clamp recording. Pipettes (glass 1.5/1.0 WPI) were pulled in two steps on a Narishige microelectrode puller and were not fire polished. Electrodes were filled with (in mM): L- Aspartic acid (monopotassium salt) 145, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 2, MES 10 (pH 6.2), and they had resistances of 2–4 M $\Omega$ . 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S (Sigma) was added to the pipette solution of the experiments indicated in the figure legends. The extracellular medium contained (in mM): L-aspartic acid 145, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, MES 10 (pH 6.2). The holding potential was –10 mV. Voltage pulses were applied from –160 to 30 mV in 10 mV steps for 300 ms. Currents were recorded using an Axopatch 200A amplifier, filtered at 5 KHz and digitized at 2.5 KHz. Currents were stored directly into the computer's hard disk through the Digidata 1200 interface (Axon Instruments). All data reported show the mean  $\pm$  standard deviation from a number (n) of independent experimental observations.

### Results

Inward K<sup>+</sup> currents were not detected in oocytes injected with cRNA of the GIRK5 or GIRK5- $\Delta$ 5 isoforms (Fig. 1B, C and E). In contrast, oocytes injected with cRNA of the shortest isoform GIRK5-

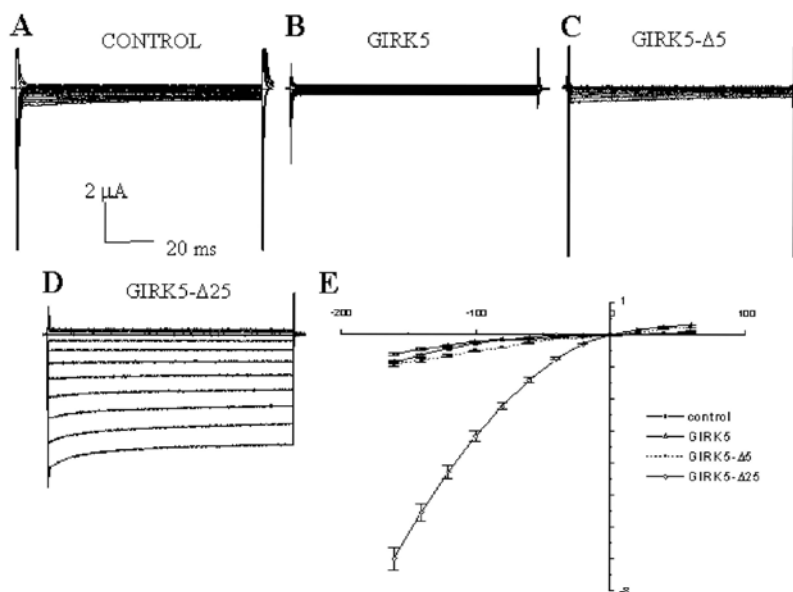


Fig. 1. Currents recordings of the GIRK5 isoforms in oocytes. Representative currents obtained from water-injected oocytes (control; A), oocytes injected with 25 ng of GIRK5 (B), GIRK5- $\Delta$ 5 (C) and GIRK5- $\Delta$ 25 (D) cRNAs. Voltage protocol stepped from  $-160$  mV to  $60$  mV in  $20$  mV increments applied during  $100$  ms from a holding potential of  $0$  mV. E: Current-voltage relationships from the currents shown above ( $n = 6$ ). Whole-oocyte currents were measured in  $118$  mM extracellular KCl.

$\Delta$ 25, expressed functional  $K^+$  channels displaying a high basal activity (i.e. without receptor stimulation; Fig. 1D, Ref. [11]).

GIRK5- $\Delta$ 25 high basal activity in the oocytes should come from channels activated by free endogenous  $G\beta\gamma$ . We carried out an experiment with oocytes coinjected with GIRK5- $\Delta$ 25 and the recombinant  $G\alpha$  cRNAs (Fig. 2) to clarify this fact. Accordingly with the above hypothesis, we observed an inhibition of GIRK5- $\Delta$ 25 by  $G\alpha$ .

To further characterize the GIRK5- $\Delta$ 25 isoform, this channel was infected in a baculovirus insect cell line. This expression system has been successfully used for the heterologous expression of ionic channels [15,16] and other membrane proteins [17,18].

Patch clamp experiments in the whole-cell configuration obtained from non-infected cells showed small currents ( $150 \pm 75$  pA at  $-160$  mV,  $n = 6$ , Fig. 3A).  $100 \mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S into the recording pipette resulted in a small increment in basal current ( $200 \pm 50$  pA,  $n = 6$ , Fig. 3A), which was not statistically significant ( $p > 0.1$ ).

Sf21 cells infected with the recombinant baculovirus containing GIRK5- $\Delta$ 25 (Fig. 3B, left), showed basal currents that were indistinguishable from the non-infected cells ( $180 \pm 45$  pA,  $n = 7$ ); however, addition of  $100 \mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S in the recording pipette resulted in the appearance of large, inwardly rectifying currents ( $1600 \pm 280$  pA at  $-160$  mV,  $n = 7$ , Fig. 3B right).

To determine if Sf21 cells express endogenous GIRK channels, RT-PCR experiments were performed with several cDNA samples. We observed that primers designed at the conserved regions of GIRKs amplified the expected band of  $432$  bp for all the GIRKs assayed: GIRK5- $\Delta$ 25, GIRK4 and GIRK1 (Fig. 3A, lanes 10, 11 and 12, respectively). Even when the antisense primer had the lowest homology with GIRK1, it also amplified this channel (lane 12). GIRKs are expressed in rat brain and according to this

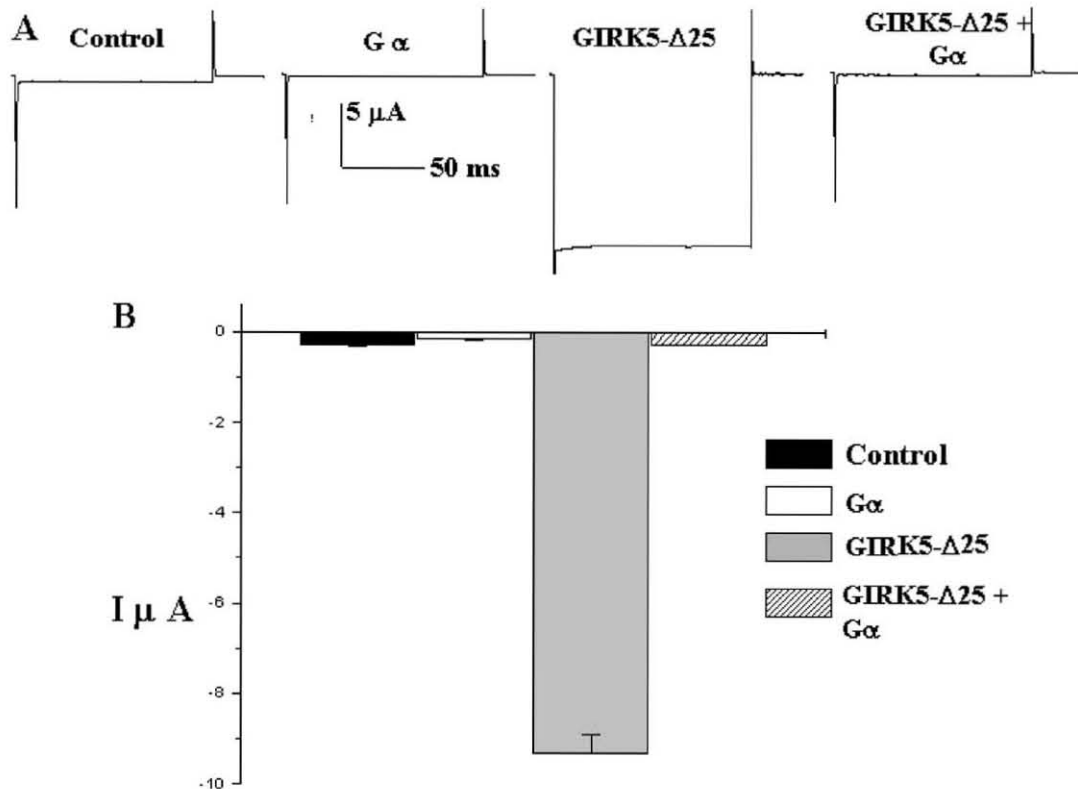


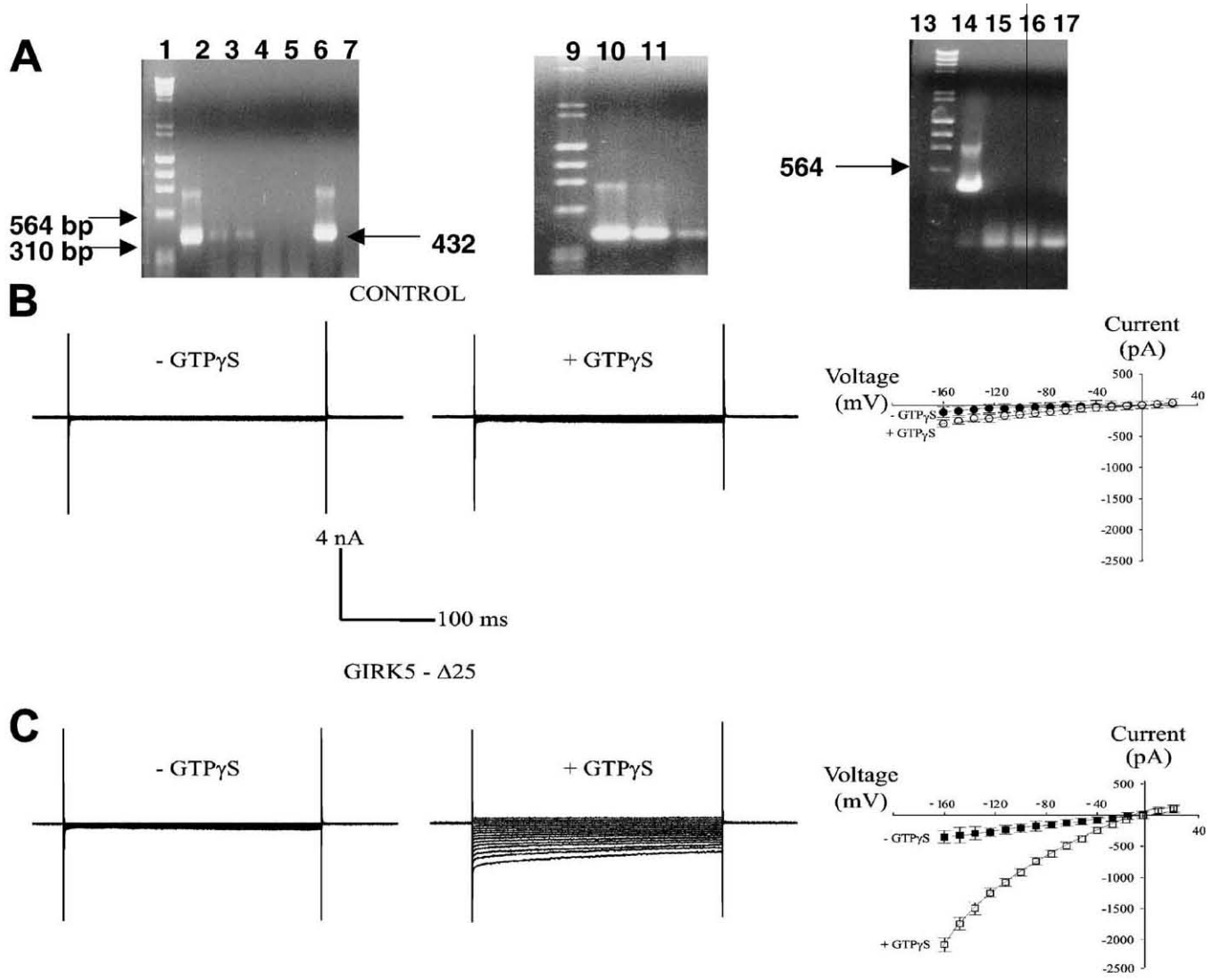
Fig. 2. Inhibition of the basal activity of GIRK5-Δ25 by Gα proteins. Currents were evoked at  $-40$  mV with a holding potential of  $0$  mV in  $118$  mM K-gluconate. (A) Time-course traces of control oocytes and oocytes injected with: Gα, GIRK5-Δ25 and GIRK5-Δ25 + Gα cRNA, respectively. (B) Histogram of the above traces: control ( $n = 4$ ), Gα ( $n = 5$ ), GIRK5-Δ25 ( $n = 6$ ) and GIRK5-Δ25 plus Gα protein ( $n = 5$ ).

fact, our primers amplified a GIRK from rat brain cDNA (lane 4). Negative controls were in agreement with non cDNA amplification for a GIRK: kidney, non-infected insect cells and insect cells infected with the bradykinin receptor; lanes 5, 6, 8, respectively. GIRK1 specific primers (lanes 14–17) amplified only with the GIRK1-pBluescript SK- vector. Sf21 (lane 15), Sf21/GIRK5Δ25 (lane 16), Sf21/BK (lane 17) cDNAs did not give any GIRK cDNA band. In conclusion, the insect cells do not express an endogenous GIRK.

Sf21 cells infected with baculovirus containing the GIRK5-Δ25 construct, did not display basal inward currents (Fig. 3B). Only after the addition of  $100$  μM GTPγS in the recording pipette, K<sup>+</sup> currents were observed (Fig. 3C), most probably because the dissociation of the endogenous Gi/Go-proteins.

In contrast to the results obtained with Sf21 cells, oocytes expressing GIRK5-Δ25 showed large basal K<sup>+</sup> currents (Fig. 1D), suggesting that in these cells there might be basal levels of GIRK channel modulators such as free Gβγ, Na<sup>+</sup>, Mg-ATP and PIP<sub>2</sub> [19]. Coexpression of GIRK1/GIRK4 heteromultimers also displays significant basal activities in oocytes [10].

A representative time course of GIRK5-Δ25 activation with  $100$  μM GTPγS in Sf21 cells is illustrated in Fig. 4. As indicated in this figure, the maximum current amplitude is obtained between 7–10 minutes after disrupting the membrane and going into the whole-cell configuration with  $100$  μM



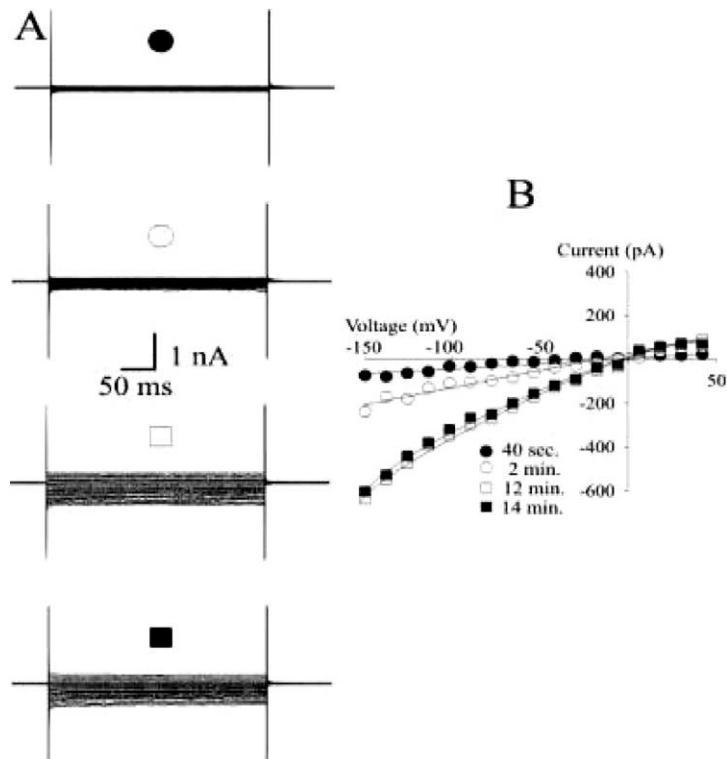


Fig. 4. Time course of current activation with GTP $\gamma$ S. A: Representative experiment illustrating the time course of the activation of inward current in Sf21 cells infected with the recombinant baculovirus containing the cDNA for GIRK5- $\Delta$ 25. B: current-voltage relationships of the currents illustrated in A obtained 40 seconds (closed circle), 2 minutes (open circle), 12 minutes (open square) and 14 minutes (close square) after establishing the whole-cell configuration. No further current increments were observed after 10 minutes of going into whole-cell. Non-infected or infected Sf21 cells with the Bk2, did not show any significant current increment in the presence of GTP $\gamma$ S. The voltage protocol was similar to the one used in Fig. 2. The pipette and bath solutions contained 145 mM KCl.

GTP $\gamma$ S in the patch pipette (Fig. 4). Non-infected cells or cells infected with Bk2 produced no significant increment in current amplitude during the 30 minutes explored in these experiments (data not shown). These results indicate a time-dependent activation of the inwardly rectifying current in cells

Fig. 3. A: 1% agarose gel with the RT-PCR products. Lane 1, 9 and 13 correspond to the molecular weight markers  $\lambda$ /Hind III  $\gamma$   $\phi$  X174 RF DNA/Hae III. Horizontal arrows indicate the size of two markers. GIRK5- $\Delta$ 25 in pBF vector as positive control [2,10]; cDNA from: oocytes [3], rat brain [4], kidney rat [5], Sf21 cells non-infected [6], Sf21 cells infected with recombinant GIRK5- $\Delta$ 25 [7] recombinant human bradykinin type 2 receptor [8]; GIRK4 [11] and GIRK1 [12]. RT-PCR with GIRK1 specific primers (lanes 14–17) GIRK1-pBluescript SK- vector [14], Sf21 [15], Sf21/GIRK5 $\Delta$ 25 [16], Sf21/BK [17] cDNAs. Functional expression of GIRK5- $\Delta$ 25 in insect cells. B: Representative whole-cell patch-clamp recordings from non-infected insect cells in the absence (-GTP $\gamma$ S) and presence (+GTP $\gamma$ S) of 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S. Current-voltage relationships illustrating the mean  $\pm$  SD obtained from 7 independent observations for each condition. C: Representative whole-cell patch-clamp recordings from insect cells infected with the recombinant baculovirus containing the GIRK5- $\Delta$ 25 cDNA. Current-voltage relationships illustrating the mean  $\pm$  SD obtained from 7 independent observations for each condition. Cell recordings in the presence of GTP $\gamma$ S were obtained 10 minutes after establishing the whole-cell configuration. The voltage protocol is similar to the one described in Fig. 1 except that the voltage steps were every 10 mV. The pipette and bath solutions contained 145 mM KCl.

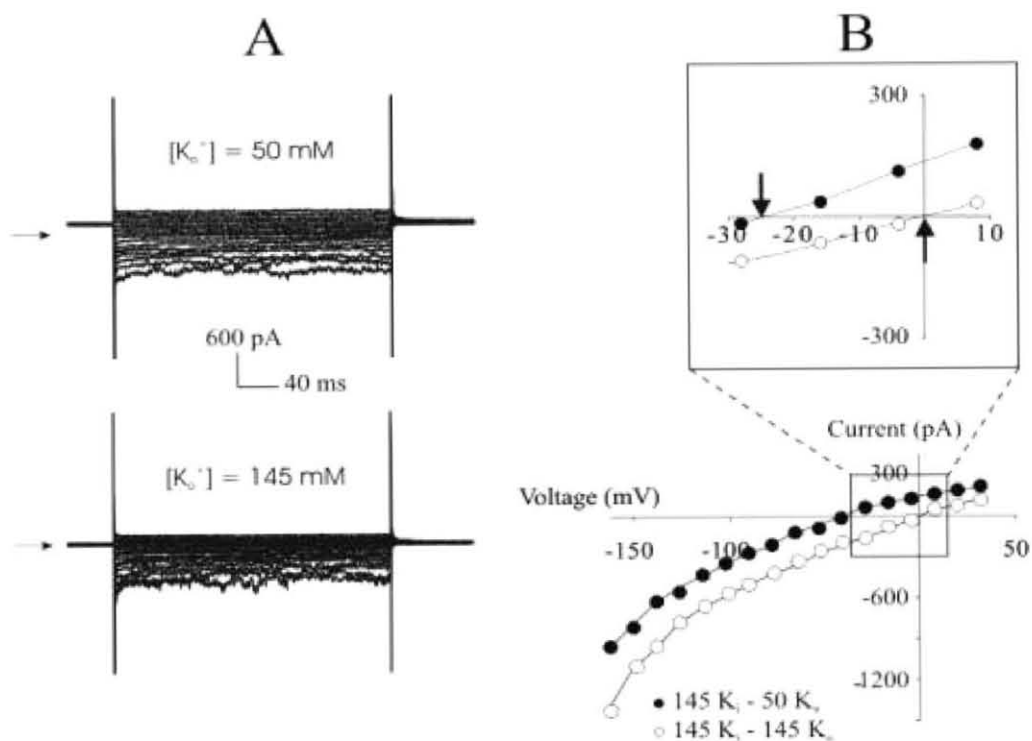


Fig. 5. GIRK5- $\Delta$ 25 is a  $K^+$  selective channel. A: Representative currents from Sf21 cells infected with the recombinant baculovirus containing the cDNA for GIRK5- $\Delta$ 25 under two different extracellular  $K^+$  concentrations. The cell was exposed to 145 mM KCl and the bath solution was replaced later with 50 mM KCl (+95 mM NaCl). Pipette solution contained 145 mM KCl and 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S. Horizontal arrows indicate the zero current level. B: current-voltage relationships obtained from the cells shown in A. The inset is a magnification to illustrate the shift in the reversal potential indicated by the vertical arrows. The voltage protocol was similar to the one used in Fig. 3.

expressing GIRK5- $\Delta$ 25. The 10-minute delay required to obtain full current activation may represent the dilution of GTP $\gamma$ S into the cell and the concomitant activation of the G-protein.

Selectivity experiments were performed to determine if the GTP $\gamma$ S-induced inwardly rectifying current from Sf21 cells was carried by  $K^+$  ions. Fig. 5 shows a representative experiment in which the GTP $\gamma$ S-induced current was studied under two extracellular  $K^+$  concentrations (50 and 145 mM). The inwardly rectifying current showed a reversal potential near 0 mV with symmetrical 145 mM  $K^+$ . Lowering extracellular  $K^+$  concentration to 50 mM caused a shift of the reversal potential to  $-25 \pm 3$  mV ( $n = 7$ ), a value near the predicted potential for a  $K^+$  selective electrode according to the Nernst equation ( $-27$  mV).

## Discussion

Functional properties of GIRK isoforms or splice variants have been poorly studied [14]. The GIRK5 gene has three in-frame ATGs which could result in three GIRK5 proteins with variable N-terminal



lengths [10]. It has not been explored yet which of these isoforms are translated in vivo. However, oocytes overexpressing GIRK5 in the absence of GIRK1 do not show Ach-stimulated currents [10]. We have shown here that neither the full-length GIRK5 and the GIRK5 $\Delta$ 5 do not express functional channels whereas GIRK5- $\Delta$ 25 produces constitutively active channels in the oocytes. Basal activities of homomultimers of a GIRK2 isoform (Kir3.2d) are very low in oocytes [20]. Interestingly, some authors may observe high basal activities of GIRK4 homomultimers in oocytes [21], while others only after its transfection in CHO cells [22].

Apparently, insect cells do not have free G $\beta\gamma$  since GIRK5- $\Delta$ 25 does not display basal activity in this system. We added GTP $\gamma$ S in the patch-pipette to dissociate the G $\beta\gamma$  complex from G $\alpha$  to produce inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents. Therefore, GIRK5- $\Delta$ 25 forms functional homotetramers in these cells, supporting the previously published observations using oocytes overexpressing this novel GIRK5 isoform [11].

The remarkably high basal activity of the GIRK5- $\Delta$ 25 isoform suggest a possible role of the N-terminal domain (residues 1–25) in the channel modulation. Chimeras of the inwardly rectifying Kir2.1, Kir2.3 and Kir3.2 channels have shown that the N-terminal end (residues 1–49) of Kir2 is a crucial structural element for heteromultimeric subunit assembly between Kir2.1 and Kir2.3 channels [23]. The N-terminal domain (T1) controls heteromultimeric subunit assembly in Kv1.2 potassium channels [24].

Ongoing experiments may help to elucidate the role of the first 25 amino acids in the functional homotetramerization and the high basal activity of the GIRK5- $\Delta$ 25 isoform. The insect cell baculovirus expression system may provide a good model to explore structural determinants of multimeric GIRK channel assembly.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the DGAPA IN220199, CONACYT 30570-M and a CONACYT fellowship (I. Mora). We thank Alicia Sampieri for her excellent technical assistance and Dr Eitan Reuveny for the G $\alpha$ , GIRK1 and GIRK4 clones.

## References

- [1] Mark MD, Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 2000;267:5830–6.
- [2] Kurachi Y, Tung RT, Ito H, Nakajima T. G protein activation of cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channels. *Progress in Neurobiology* 1992;39:229–46.
- [3] Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot JP. Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain. *FEBS Lett* 1994;353:37–42.
- [4] Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirivic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel I<sub>KACH</sub> is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins. *Nature* 1995;374:135–41.
- [5] Wickman KD, Iniguez-Lluhl JA, Davenport PA, Taussig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE. Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* 1994;368:255–7.
- [6] Soejima M, Noma A. Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch* 1984;400:424–31.
- [7] Chan KW, Langan MN, Sui JL, Kozak JA, Pabon A, Ladas JAA, Logothetis DE. A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J Gen Physiol* 1996;107:381–97.

- [8] Iizuka M, Kubo Y, Tsunenari I, Pan CX, Akiba I, Kono T. Functional characterization and localization of a cardiac-type inwardly rectifying  $K^+$  channel. *Receptors Channels* 1995;3:299–315.
- [9] Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993;364:802–6.
- [10] Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying  $K^+$  channel subunit that permits GIRK1 expression of  $I_{K_{ACH}}$  currents in oocytes. *Neuron* 1996;16:423–9.
- [11] Salvador C, Martínez M, Mora SI, Waskar E, Fariás JM, Gamba G, Escobar LI. Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim Biophys Acta* 2001;1512:135–47.
- [12] Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989;108:229–41.
- [13] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: A laboratory manual*. New York: W.H. Freeman and company; 1992.
- [14] Inanobe A, Horio Y, Fujita A, Tanemoto M, Hibino H, Inageda K, Kurachi Y. Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J Physiol* 1999;521:19–30.
- [15] Klaiber K, Williams N, Roberts TM, Papazian DM, Jan LY, Miller C. Functional expression of *Shaker*  $K^+$  channels in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* 1990;5:221–6.
- [16] Gómez-Lagunas F. Shaker B  $K^+$  conductance in  $Na^+$  solutions lacking  $K^+$  ions: a remarkably stable non-conducting state produced by membrane depolarizations. *J Physiol* 1997;499:3–15.
- [17] Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel is important for channel activation. *Neuron* 1995;5:1133–43.
- [18] Seibert C, Harteneck C, Ernst OP, Schultz G, Hofmann KP. Activation of the rod G-protein Gt by the thrombin receptor (PAR1) expressed in Sf9 cells. *Eur J Biochem* 1999;266:911–6.
- [19] Huang C, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by  $G\beta\gamma$ . *Nature* 1998;391:803–6.
- [20] Inanobe A, Horio Y, Fujita A, Tanemoto M, Hibino H, Inageda K, Kurachi Y. Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J Physiol* 1999;521:19–30.
- [21] Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. *J Biol Chem* 1998;273:1324–8.
- [22] Bender K, Wellner-Kienitz M, Inanobe A, Meyer T, Kurachi Y, Pott L. Overexpression of monomeric and multimeric GIRK4 subunits in rat atrial myocytes removes fast desensitization and reduces inward rectification of muscarinic  $K^+$  current ( $I_{K(Ach)}$ ). *J Biol Chem* 2000;276:28873–80.
- [23] Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Lesage F, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. Dominant negative chimeras provide evidence for homo and heteromultimeric assembly of inward rectifier  $K^+$  channel proteins via their N-terminal end. *FEBS Letters* 1996;378:64–8.
- [24] Li M, Jan YN, Jan LY. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 1992;257:1225–30.