



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la cinasa SGK1 sobre los canales catiónicos HCN2 y HCN4

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Erika Gutiérrez Vásquez

TUTOR PRINCIPAL
Laura Escobar Pérez
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
María Elena Ibarra Rubio
[Facultad de Química](#)

Marina Macías Silva
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Escobar Pérez, por dirigir esta tesis y por todo el apoyo que me brindó.

A los miembros del comité tutor, por asesorar el desarrollo de esta tesis:

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dra. Marina Macías Silva

A los miembros del jurado para el examen de grado, por leer este trabajo y por sus valiosas observaciones.

Presidente León David Islas Suárez

Vocal Froylan Gómez Lagunas

Vocal José de Jesús García Valdés

Vocal Juan Carlos Gómora Martínez

Secretario Luis Alfonso Vaca Domínguez

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

A la Facultad de Medicina, UNAM.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (número de becario: 576711).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca otorgada (obtención de grado) como parte del proyecto IN214316.

A la M. en C. Carolina Salvador Hernández, por el apoyo técnico y por cuidar siempre de nosotros.

A mis padres y hermanos, por todo su amor y por estar siempre ahí para mí.

A mi esposo e hija, por su amor incondicional y por hacer mis días felices.

A Clau, Tere y Olmo, por su amistad, por todo el apoyo y por compartir conmigo sus locuras.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Miguel, Daniel, Omar y Zina, por hacer del laboratorio un lugar agradable.

Este proyecto fue apoyado por los donativos UNAM (PAPIIT: IN214613, IN214316) y CONACyT (166913, 253586).

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	4
Resumen	6
Introducción	8
Canales iónicos	8
Canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN)	10
Estructura, distribución, cinética y regulación	10
Regulación de canales iónicos por la cinasa inducible por suero y glucocorticoides (SGK1)	17
Anatomía y fisiología renal	18
Homeostasis del potasio (K ⁺)	20
Manejo renal del K ⁺	21
Antecedentes	25
Objetivo	29
Hipótesis	29
Materiales y métodos.	30
Resultados	36
Discusión	52
Conclusiones	60
Perspectivas	60
Referencias	61
Anexo	70

ABREVIATURAS

Akt/ PKB	Proteína cinasa homóloga a la proteína viral v-Akt (también conocida como proteína cinasa B)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ASDN	Nefrona distal sensible a aldosterona
ATP	Trifosfato de adenosina
AQP2	Acuaporina tipo 2
CAP1	Proteína activadora de canal tipo 1
CaMKII	Proteína cinasa II calmodulina dependiente
cGKII	Proteína cinasa II dependiente de GMPc
CCC	Conducto colector cortical
CNT	Túbulo conector
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
DAH	Porción delgada ascendente del Asa de Henle
DDH	Porción delgada descendente del Asa de Henle
ENaC	Canal epitelial de sodio
FSH	Hormona folículo estimulante
GAH	Porción gruesa ascendente del Asa de Henle
HCN	Canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
Ih	Corriente activada por hiperpolarización
KChAP	Chaperona de canales de K ⁺
KCR1	Proteína reguladora de canales de K ⁺
KS-WNK	Cinasa sin lisina específica de riñón
Kv1.3	Canal de potasio activado por voltaje 1.3
MaxiK	Canal de potasio de alta conductancia
MinK	Proteína mínima del canal de K ⁺
Mint2	Proteína blanco de interacción nuclear
MiRP1	Proteína relacionada con MinK
NCC	Cotransportador Na ⁺ /Cl ⁻
Nedd4-2	Ubiquitin ligasa E3
NHE	Intercambiador sodio-protón (Na ⁺ /H ⁺)
NHERF2	Cofactor regulador del intercambiador Na ⁺ /H ⁺ NHE
NKCC2	Cotransportador sodio-potasio-cloruro (Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻) tipo 2
p38-MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
PDK1	Proteína cinasa dependiente de fosfatidil-inositol trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
ROMK	Canal de potasio de la médula externa renal
sAC	Adenilato ciclasa soluble
SGK1	Cinasa inducible por suero y glucocorticoides tipo 1
S-SCAM	Molécula de andamiaje sináptica (también denominada guanilato-cinasa invertida asociada a la membrana)
STx-3	Sintaxina tipo 3
TCD	Túbulo contorneado distal

TCN	Túbulo conector
TCP	Túbulo contorneado proximal
TRP	Túbulo recto proximal
TRIP8b	Tetratricopéptido con dominio de interacción para la proteína Rab8b
V-ATPasa	ATPasa vacuolar transportadora de protones
WNK	Cinasa sin lisina

RESUMEN

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) son responsables de generar potenciales espontáneos en el corazón y en el sistema nervioso central. Existen cuatro miembros de la familia HCN (HCN1-4), que se han caracterizado ampliamente en el cerebro, corazón y en sistemas heterólogos. Los canales HCN también se encuentran en tejidos no excitables en mamíferos, donde su función fisiológica no se ha dilucidado del todo.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se identificó a la familia de canales HCN en el riñón de la rata y se observó que se expresan de manera diferencial a lo largo de la nefrona. En particular, el canal HCN2 se localiza en las células intercaladas que secretan ácido en el riñón de la rata y participa en el transporte transcelular de amonio (NH_4^+), potasio (K^+) y sodio (Na^+). El canal HCN4 se encuentra, tanto en su forma completa como proteolizada (más abundante), en varios segmentos de la nefrona, incluidos el conducto colector cortical y medular.

El balance de Na^+ y K^+ se regula en dichos segmentos distales de la nefrona por varias hormonas: aldosterona, vasopresina, angiotensina II e insulina. En la región distal sensible a aldosterona el K^+ entra a la célula a través de la ATPasa Na^+/K^+ basolateral y, en condiciones basales, se secreta en el espacio urinario por difusión pasiva a través de los canales de K^+ apicales (ROMK, MaxiK y Kv1.3). La expresión de estos últimos incrementa por una ingesta elevada de K^+ , mientras que disminuye por la dieta deficiente de K^+ . Por ello, anteriormente, se evaluó el efecto de la dieta alta y baja en K^+ sobre la abundancia del canal HCN2 y HCN4; ambos se regulan de manera diferencial por efecto de las dietas.

La aldosterona desempeña un papel fundamental en la reabsorción de Na^+ y la excreción K^+ en la orina; la cinasa SGK1 media la señalización de la aldosterona mediante la activación de distintos canales de Na^+ y K^+ en la nefrona distal. Encontramos que los canales HCN2 y HCN4 poseen en el extremo carboxilo y

amino, respectivamente, la secuencia consenso RXX(S/T) para SGK1. Por ello, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la SGK1 sobre la actividad de estos canales, así como obtener el canal HCN4 truncado hacia el carboxilo terminal, para mimetizar la forma proteolizada (observada en riñón) y, comprobar si es funcional.

Para ello realizamos ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la aplicación de la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Se utilizó el canal Kv1.3 humano como un control positivo de la expresión y actividad de SGK1. Nuestros resultados revelan que la cinasa SGK1 no afecta al canal HCN2. Por lo tanto, es probable que otras cinasas y/o ubiquitin ligasas participen en la regulación del canal HCN2 en las células principales e intercaladas de la nefrona distal durante una dieta alta en K⁺.

Por el contrario, observamos que la co-expresión con la cinasa SGK1 reduce la amplitud de la corriente generada por el canal HCN4 cortado hacia el carboxilo terminal. Dicha disminución también se observa con la cinasa SGK1 inactiva, por lo tanto, es probable que esté involucrado un proceso de interacción proteína-proteína.

INTRODUCCIÓN

Canales iónicos

Todas las células están delimitadas por una membrana que les permite mantener un ambiente interno favorable para la vida. La membrana plasmática es un complejo supramolecular compuesto por fosfolípidos, proteínas (transmembranales y periféricas), carbohidratos y colesterol. Debido a su composición es una barrera selectivamente permeable que separa físicamente a la célula del ambiente externo, con lo que regula la composición del medio interno. Su estructura básica está determinada por la bicapa lipídica pero la mayoría de sus funciones son desempeñadas por proteínas (Alberts, 2002).

Los canales iónicos, son proteínas transmembranales que forman poros hidrofílicos que atraviesan la bicapa lipídica y permiten el paso de iones. Suelen presentar una elevada selectividad para determinada especie iónica y se caracterizan por un potencial específico de activación. El paso de iones a través de ellos siempre es a favor del gradiente electroquímico. Respecto a su eficiencia de transporte, los canales permiten que iones con el tamaño y carga adecuados crucen la membrana a velocidades que pueden alcanzar hasta 10^8 iones/segundo (Hille, 2001).

Los poros formados por los canales iónicos son estrechos, selectivos y no se encuentran abiertos de forma permanente (Figura 1), sino que se abren en respuesta a un estímulo específico. Los principales mecanismos de regulación son: el cambio en el potencial de membrana (canales sensibles a voltaje), la unión de un ligando intracelular o extracelular (regulados por ligando) y en algunos casos estímulos mecánicos o cambios de temperatura (Aidley, 1998; Cesare et al., 1999).

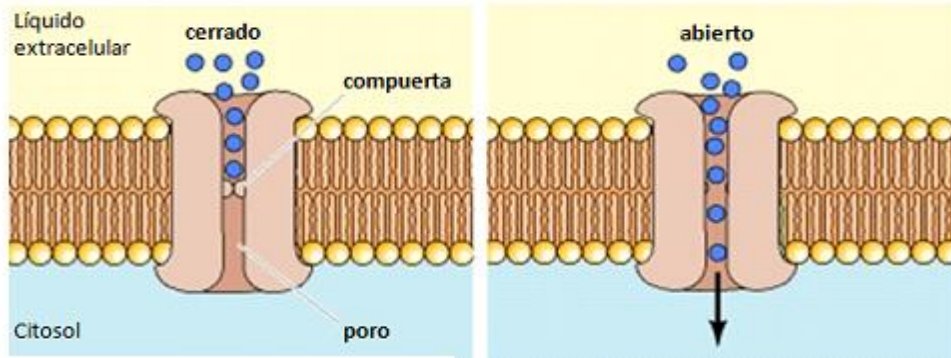


Figura 1. Canales iónicos (editada de Cooper, 2000). Muestra el mecanismo de transporte a través de un canal. En la conformación cerrada el flujo de iones es bloqueado por una “compuerta”. La apertura de la compuerta permite rápidamente el flujo de iones a través del canal. *Por simplicidad en esta imagen se describe el paso de solutos desde el líquido extracelular hacia el citosol, sin embargo, el transporte también ocurre en la dirección contraria, esto depende del tipo de canal y del gradiente de concentración del ion que transporte.

Los canales dependientes de voltaje se activan en respuesta a variaciones en el potencial de membrana y desempeñan una función clave en los mecanismos que determinan la liberación de neurotransmisores así como en la despolarización y repolarización del potencial de membrana. De esta manera, participan en la actividad rítmica espontánea de las células marcapaso. La mayoría se abren después de una despolarización, es decir, el cambio del potencial de membrana hacia valores menos negativos que su potencial en reposo, pero también existen canales que se activan cuando ocurre una hiperpolarización, es decir, un cambio del potencial en reposo hacia valores más negativos (Alberts, 2002).

Canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN)

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) permiten el flujo de Na^+ y de K^+ en condiciones fisiológicas (Ludwig et al., 1999; Biel et al., 2009; Kusch et al., 2010). Nuestro laboratorio demostró que en el tejido renal los canales HCN también transportan amonio (Carrisoza et al., 2011). Existen 4 subtipos (HCN1-4) y se encuentran distribuidos en los tejidos nervioso y cardíaco (Biel et al., 2009).

El flujo de iones Na^+ , a través de los HCN, genera una corriente entrante llamada I_h (Biel et al., 2009; Wahl-Schott y Biel, 2009), característica en el corazón y el cerebro para el control de la actividad de marcapasos eléctrico. Esta corriente contribuye con diversas funciones nerviosas, incluyendo la determinación del potencial de membrana en reposo, la generación de actividad eléctrica sincrónica en las neuronas, la regulación de la integración dendrítica y la transmisión sináptica. Por lo anterior, está implicada en múltiples procesos fisiológicos como los latidos del corazón, los ciclos sueño-vigilia, el aprendizaje, la memoria, la sensación y percepción (He et al., 2014).

Estructura, distribución, cinética y regulación

Los canales HCN están distribuidos en el corazón y el cerebro, sin embargo, también se ha reportado su expresión en tejidos no excitables (Tabla 1). Cada canal posee 4 subunidades que se ensamblan para formar un poro. Cada subunidad presenta 6 dominios transmembranales (S1-S6), incluyendo uno cargado positivamente (S4) que funciona como sensor de voltaje (Vaca et al., 2000) y un dominio de unión de nucleótidos cíclicos (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD) en el carboxilo terminal (Figura 2). En la región del poro tienen un motivo glicina-tirosina-glicina (GYG) entre S5 y S6, que funciona como filtro de selectividad en los canales de K^+ (Wahl-Schott y Biel, 2009; Macri et al., 2012).

Tabla 1. Distribución de la familia de canales HCN en la rata

Canal	Localización
HCN1	Hipocampo, neo-corteza, cerebelo, tallo encefálico, ganglios de la raíz dorsal, médula espinal, nódulo sino auricular, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.
HCN2	Tálamo, tallo encefálico, bulbo olfativo, ganglios de la raíz dorsal, células cardiacas, riñón, ovario, células pancreáticas, retina y glándula pituitaria.
HCN3	Cerebro, bulbo olfativo, ganglios de la raíz dorsal, corazón, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.
HCN4	Bulbo olfativo, tálamo, nódulo sinoauricular, fibras de Purkinje, ganglios de la raíz dorsal, retina, ovario, células pancreáticas, glándula pituitaria, riñón.

Santoro et al., 2000; Kaupp, 2001; Muller et al., 2003; El-Kholy et al., 2007; Bolivar et al., 2008; Yeh et al., 2008; Kouranova et al., 2008; Calejo et al., 2014.

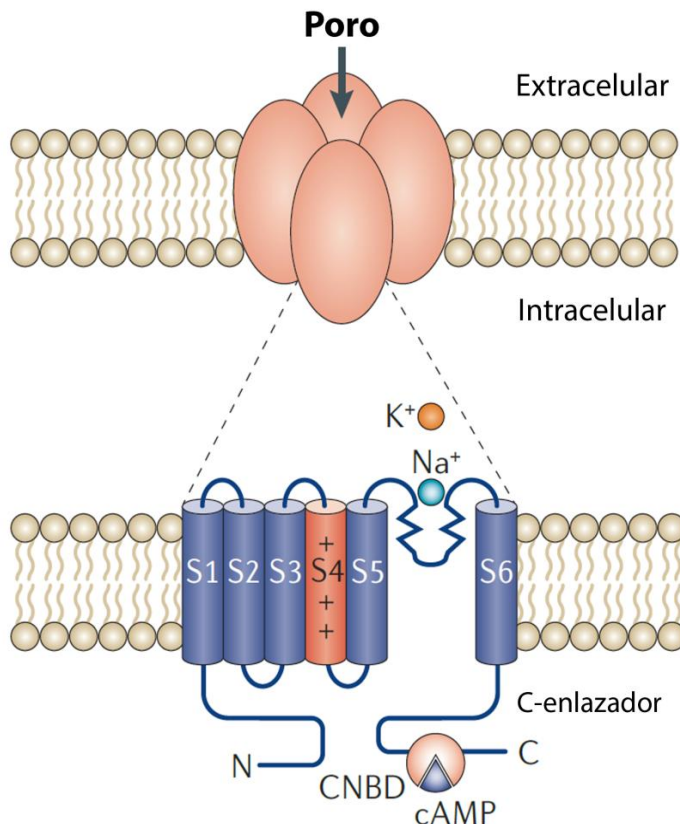


Figura 2. Estructura de los canales HCN (editado de Postea y Biel, 2011). Arriba: las cuatro subunidades se ensamblan en tetrámeros (homoméricos o heteroméricos). Abajo: se muestra una subunidad completa con sus seis segmentos transmembranales (S1-S6), el dominio sensor de voltaje cargado positivamente (S4) y la región del poro entre S5 y S6. El carboxilo terminal de los canales HCN contiene a la región C-enlazadora y el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) que media su respuesta a AMPc.

La expresión y propiedades funcionales de los canales HCN se diversifican para adaptarse a sus papeles fisiológicos correspondientes, a través de una regulación

precisa. A corto plazo se regulan por proteínas o metabolitos celulares que interactúan directamente con los canales, por proteínas cinasas que inducen su fosforilación, por neurotransmisores, así como por la concentración intracelular de iones cloruro y protones (Figura 3). Mientras que a largo plazo se regula su expresión, heteromerización o redistribución subcelular (He et al., 2014).

Las proteínas cinasas son importantes en la regulación de los canales HCN, puesto que algunas son capaces de modificar la función del canal y su expresión en la membrana celular. Entre estas cinasas se encuentran la tirosina cinasa Src, la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (p38-MAPK), la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa II dependiente de GMPc (cGKII).

La tirosina cinasa Src regula la actividad de los canales HCN2 y HCN4 por la fosforilación directa de un residuo de tirosina altamente conservado en su secuencia de aminoácidos: Tyr 476 en HCN2 y Tyr 554 en HCN4 (Yu et al., 2004; Zong et al., 2005). Esta fosforilación acelera la activación e incrementa la amplitud de la corriente I_h ; en el caso del canal HCN4 también se ha observado que cambia el potencial de activación hacia valores más positivos por la fosforilación de la Tyr 531 (Li et al., 2008).

La activación de la p38-MAPK desplaza el potencial de activación de los canales hacia valores más positivos (Poolos et al., 2006), mientras que la activación de la PKC reduce la amplitud de la corriente I_h , causa un desplazamiento en el potencial de activación del canal HCN1 hacia valores más negativos y disminuye su expresión en la membrana plasmática, mediante un incremento en la fosforilación del canal (Liu et al., 2003; Williams et al., 2015). Tanto en el caso de la p38-MAPK como de la PKC aún no se ha dilucidado si el mecanismo de regulación sobre los HCN es por fosforilación directa de los canales, por la activación de segundos mensajeros o por la activación de otras proteínas cinasas.

La proteína cinasa II dependiente de GMPc desplaza el potencial de activación del canal HCN2 hacia valores más negativos. Dicho efecto está asociado a la

fosforilación de la serina 641, que está altamente conservada en las demás isoformas del canal (Hammelmann et al., 2011).

La PKA desplaza el potencial de activación del canal HCN4 hacia valores más positivos por fosforilación directa del canal en la región del carboxilo terminal (Liao et al., 2010). Por otra parte, se sugiere que la proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) regula el tráfico y la expresión en la superficie de los canales HCN, puesto que su inhibición promueve la redistribución del HCN1 en hipocampo (Shin y Chetkovich, 2007).

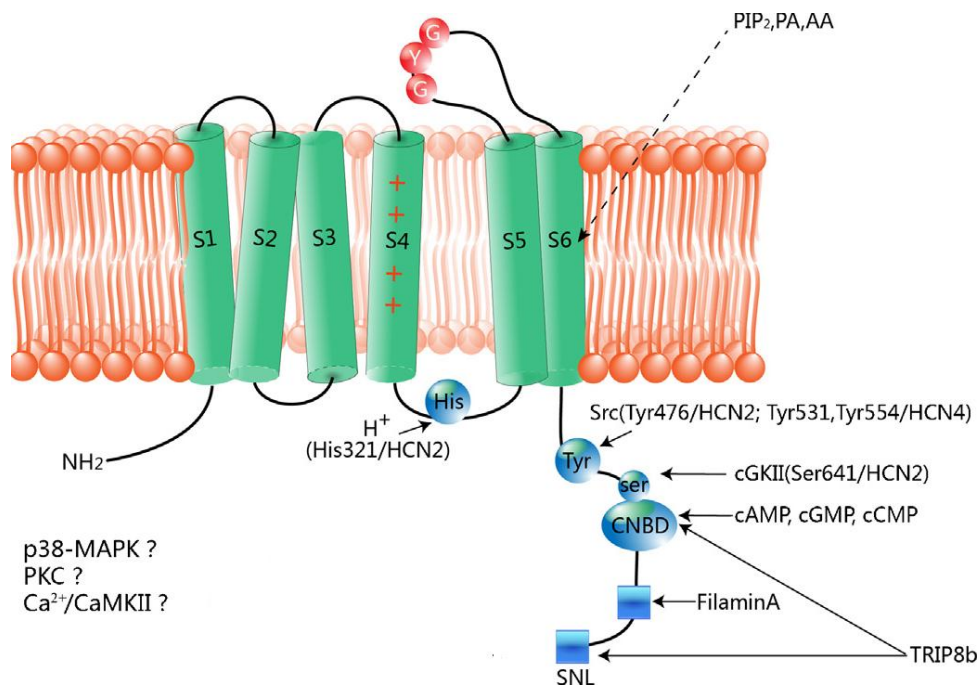


Figura 3. Regulación de la función de los canales HCN por moléculas pequeñas, proteínas cinasas e interacción con proteínas (He et al., 2014).

Hasta la fecha no se conoce bien el mecanismo de tráfico a la membrana y redistribución celular de los canales HCN ni la regulación de los mismos. Como ya se mencionó, se ha observado que la activación de algunas cinasas tales como la PKC o la CaMKII afectan el tráfico de algunos HCN a la membrana. Sin embargo, aún no se sabe si la regulación es 1) por la fosforilación; 2) por la interacción directa de las cinasas con el canal o 3) por que las cinasas interaccionan con

proteínas como TRIP8b, filamina A o tamalina (proteínas de andamiaje) que se han relacionado con la regulación del tráfico de los canales HCN.

TRIP8b es una proteína citoplasmática del cerebro que interacciona con el carboxilo terminal de las subunidades de los canales HCN en el dominio de unión a nucleótidos cíclicos y modula la expresión en la superficie del canal HCN1 (Santoro et al., 2004; Santoro et al, 2011). Existen varias isoformas de TRIP8b y cada una regula de manera diferencial la expresión en la superficie celular del canal HCN1 en el cerebro (Lewis et al., 2009; Santoro et al., 2009).

La filamina A es una proteína citoplasmática de andamiaje con dominios de unión a actina cuya función principal es enlazar las proteínas transmembranales con el citoesqueleto. La filamina A interacciona con el canal HCN1 a través de una región de 22 aminoácidos que se encuentra río abajo del CNBD y afecta su localización en la membrana celular (Gravante et al, 2004). Esta región no se conserva en las otras isoformas del canal, por ello se sugiere que la filamina A regula específicamente al HCN1.

El HCN2 interacciona con otras proteínas de andamiaje como tamalina, S-SCAM y Mint2 a través de sitios de interacción presentes en el C-terminal de sus subunidades. Estas proteínas están implicadas en el tráfico de canales y transportadores desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por ello se sugiere que podrían desempeñar un papel importante en el tráfico o distribución del HCN2 (Kimura et al., 2004).

Además de la fosforilación, otras modificaciones postraduccionales como la glicosilación y la sumoilación (unión covalente del péptido SUMO: pequeño modificador relacionado con la ubiquitina) también participan en la regulación del tráfico de los canales HCN a la membrana. Todas las isoformas del canal HCN tienen una secuencia consenso de glicosilación (N-X-S/T) en el dominio extracelular entre los segmentos transmembranales S5 y S6. Los canales HCN1 y HCN2 se encuentran N-glicosilados en el cerebro (Zha et al., 2008). La

glicosilación no es necesaria para que los canales sean funcionales pero sí es fundamental para su expresión en la superficie celular (Much et al., 2003).

Recientemente se reportó que el canal HCN2 posee varios sitios consenso susceptibles de sumoilación y que algunos de ellos se conservan en las demás isoformas del canal. La sumoilación incrementa la expresión en la membrana del canal HCN2. Dado que la principal función de la sumoilación es facilitar las interacciones proteína-proteína se sugiere que el mecanismo por el que regula el tráfico del canal podría estar relacionado con el favorecimiento de la interacción con proteínas de andamiaje como TRIP8b o S-SCAM (Parker et al., 2016).

También se propone a la proteólisis de las subunidades del canal como un mecanismo de regulación, puesto que se ha demostrado que tiene un papel importante en la formación de heteromultímeros. En el miocardio de ratón el canal HCN2 está proteolizado hacia el carboxilo terminal y se co-ensambla con el canal HCN4 para formar heteromultímeros funcionales (Ye y Nerbonne, 2009).

Calejo y colaboradores sugieren que, además de la glicosilación, la proteólisis podría intervenir en la expresión de los HCN en la membrana celular. Plantean que el corte selectivo de las subunidades de los canales HCN por metaloendopeptidasas unidas a la membrana podría contribuir a la variedad de propiedades de los canales HCN nativos en diferentes tejidos. Además, demuestran que los canales poseen sitios consenso en diferentes regiones con elevada probabilidad de ser procesados por proteasas (Figura 4; Calejo et al., 2014).

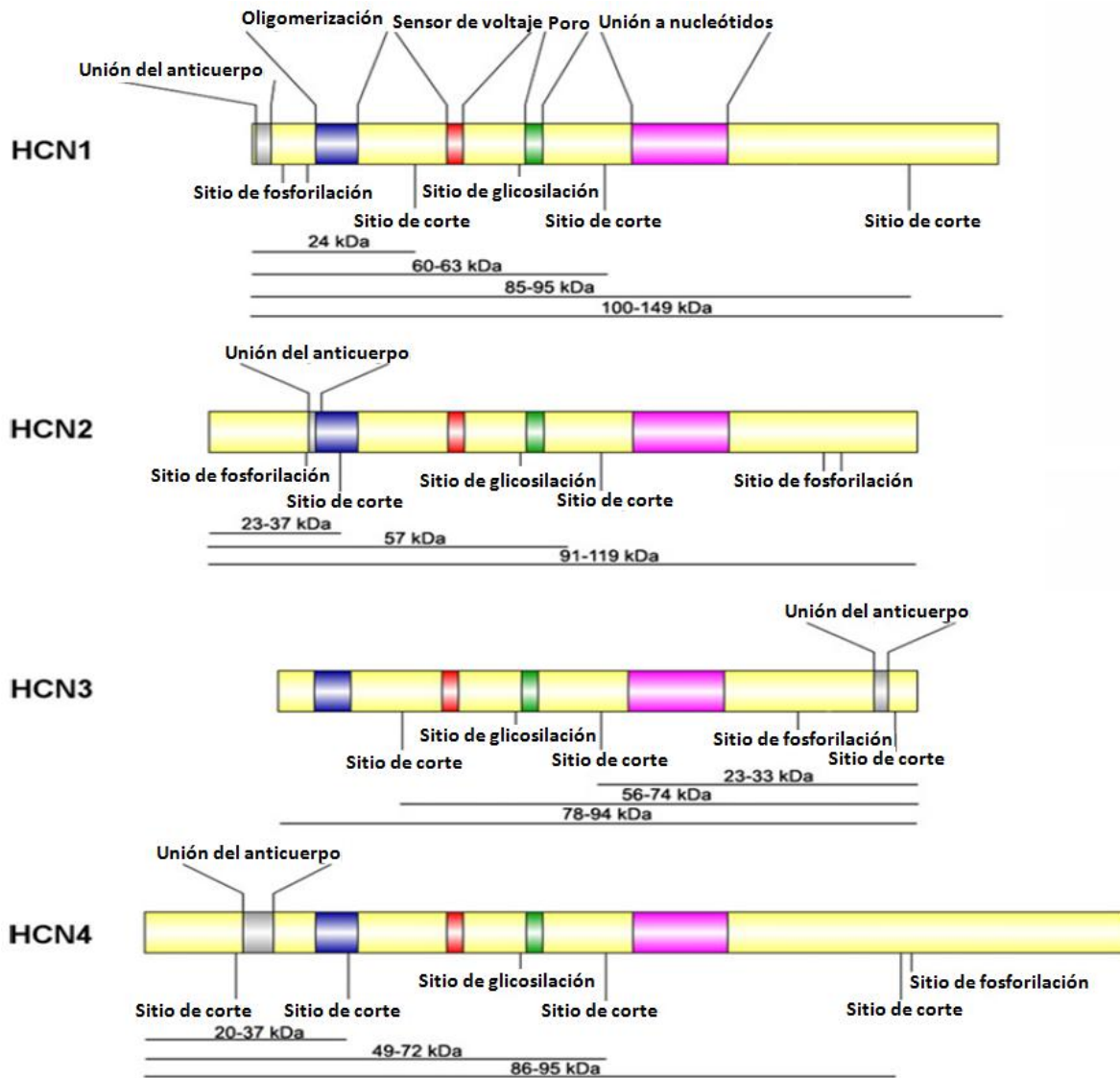


Figura 4. Diagrama de las diferentes isoformas de HCN (HCN1-4) que muestra sitios específicos de fosforilación, N-glicosilación y escisión (editada de Calejo et al., 2014)

Regulación de canales iónicos por la cinasa inducible por suero y glucocorticoides (SGK1)

La cinasa inducible por suero y glucocorticoides (SGK1) se clonó de células de tumor mamario de rata y debe su nombre a que se identificó como un gen estimulado transcripcionalmente por suero y glucocorticoides (Webster et al., 1993). Ahora se sabe que también se estimula por mineralocorticoides, gonadotropinas, progesterona, eritropoyetina, 1,25 dihidroxivitamina D3, factor de crecimiento derivado de plaquetas, etc. La expresión de la SGK1 también se estimula por concentraciones elevadas de glucosa, acidosis metabólica, radiación UV, isquemia y estrés oxidativo (Lang y Stournaras 2013).

Además de la cantidad de transcrito, la regulación de la SGK1 también ocurre por modificaciones postraduccionales en la proteína que impactan directamente en la actividad de la cinasa. La activación de la SGK1 requiere la fosforilación de la serina 422 por la PDK2 (proteína cinasa dependiente de fosfatidil-inositol trifosfato), seguida de la fosforilación de la treonina 256 por la PDK1 (Kobayashi y Cohen 1999). La SGK1 se activa por varios factores de crecimiento, insulina, hormona foliculoestimulante (FSH), trombina y corticosterona (Lang y Stournaras 2013).

En mamíferos la SGK1 es prácticamente ubicua; se encuentra en páncreas, hígado, músculo cardíaco, pulmón, placenta, riñón, cerebro, entre otros (Waldegger et al., 1997; Lang et al., 2009) y es un potente estimulador de varios canales iónicos, por lo que tiene un papel importante en una variedad de funciones fisiológicas, tales como la regulación del volumen celular, exocitosis, proliferación celular, excitación y transporte epitelial (Lang y Shumilina, 2013).

Los mecanismos a través de los que la SGK1 regula a los diferentes canales incluyen la fosforilación directa en la secuencia consenso RXRXX(S/T) presente en sus blancos (Kobayashi y Cohen 1999), la activación de otras proteínas cinasas, la estimulación de la expresión de genes (por la regulación a la alta de

factores de transcripción) y la estabilización de las proteínas en la membrana por la fosforilación e inactivación de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 (Lang et al., 2014).

Anatomía y fisiología renal

Los riñones son órganos reguladores y excretores que realizan diversas funciones, entre las que se encuentran: 1) la excreción de productos de desecho; 2) la regulación del equilibrio hidro-electrolítico y de la presión arterial; 3) el mantenimiento del equilibrio ácido-base; 4) la regulación de la producción de eritrocitos; 5) la secreción, metabolismo y excreción de hormonas; 6) la producción de calcitriol (vitamina D3). Cabe resaltar que la función excretora de los riñones es crucial para regular la composición y el volumen de los líquidos corporales (Guyton y Hall, 2011).

Los riñones se sitúan en la pared posterior del abdomen fuera de la cavidad peritoneal, a ambos lados de la columna vertebral. Forman parte del aparato urinario junto con la vejiga, uréteres y uretra. (Guyton y Hall 2011; Koeppen y Stanton, 2009). Cada riñón está rodeado por una cápsula fibrosa de tejido conectivo que protege sus estructuras internas. En un corte sagital se observan dos regiones principales: una región externa o corteza, y una región interna, la médula. Ambas regiones se componen de nefronas, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Guyton y Hall, 2011).

La nefrona es la unidad funcional del riñón. Cada riñón tiene alrededor de 1.2 millones de nefronas (Boron, 2009), cuya regeneración es muy lenta, por lo que hay una reducción gradual de su número por lesión, enfermedad o envejecimiento (Maeshima, 2003; Bruno 2014). Cada nefrona está integrada por los segmentos siguientes: el glomérulo (rodeado por la cápsula de Bowman), el túbulo contorneado y recto proximal, el asa de Henle (con una rama descendente delgada, una ascendente delgada y una ascendente gruesa), el túbulo

contorneado distal y el conducto colector (Figura 5). Cada segmento está compuesto por diferentes tipos celulares con funciones de transporte específicas.

Los iones se transportan desde el lumen tubular hacia el intersticio o viceversa por vía transcelular o paracelular. En la primera, la velocidad del transporte de los iones depende de los gradientes electroquímicos, de los canales iónicos y de los transportadores presentes en las membranas apical y basolateral; mientras que en la segunda, los iones pasan a través de las uniones estrechas entre las células (Boron, 2009).

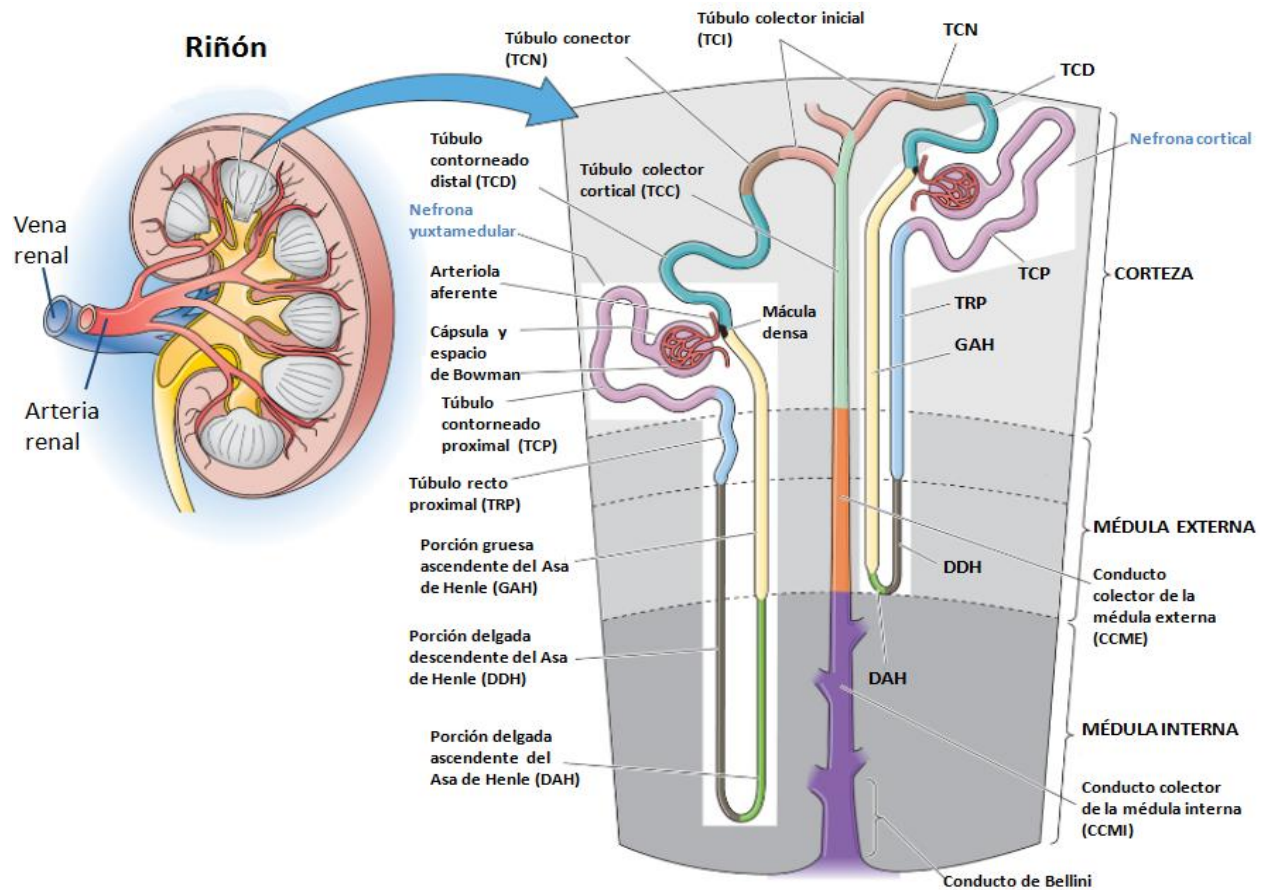


Figura 5. Estructura de la nefrona (editada de Boron, 2009)

La formación de orina, mecanismo por el que se excretan diferentes cantidades de agua, iones y productos de desecho, es el resultado de tres procesos renales:

- 1) Filtración glomerular.

- 2) Reabsorción de sustancias de los túbulos renales hacia la sangre.
- 3) Secreción de sustancias desde la sangre hacia los túbulos.

Cada uno de estos procesos se regula de acuerdo a las necesidades del organismo. En el proceso de filtración glomerular, una gran cantidad de agua y solutos pasa desde los capilares glomerulares hacia la cápsula de Bowman. La mayor parte de las sustancias del plasma se filtran libremente, excepto las proteínas plasmáticas debido a su tamaño y carga negativa.

A medida que el ultrafiltrado del plasma abandona la cápsula de Bowman y pasa por el túbulo de células epiteliales, su composición se modifica por la reabsorción de agua y solutos hacia la sangre, y por la secreción de algunas sustancias desde los capilares peritubulares hacia la luz tubular. De este modo, el riñón regula la excreción o reabsorción de diferentes sustancias dependiendo de las necesidades del organismo.

Homeostasis del potasio (K^+)

El K^+ es el catión intracelular más abundante y su concentración extracelular se encuentra regulada en 4.2 mEq/L, aproximadamente. El mantenimiento de dicha concentración es de vital importancia puesto que muchas funciones celulares son sensibles a los cambios en la concentración de K^+ , algunas de ellas son: la regulación del volumen y pH celulares, la síntesis de ADN y proteínas, el crecimiento, la función enzimática, el potencial de membrana en reposo, la actividad neuromuscular y cardíaca (Guyton y Hall, 2011; Koeppen y Stanton, 2009).

La mayor parte del K^+ total corporal (~98%) se encuentra dentro de las células, y solo el 2% en el líquido extracelular, esto dificulta el mantenimiento de su homeostasis en este último compartimento. Existe un continuo movimiento de potasio entre el compartimento intracelular y extracelular. El K^+ se concentra en el fluido intracelular gracias a la ATPasa Na^+/K^+ que está presente en la mayoría de

las células, de manera simultánea el K^+ sale de la célula a través de canales de potasio. Las tasas relativas de entrada y salida de K^+ determinan la cantidad absoluta de este ion en cada compartimento (Weiner y Wingo, 1998).

Tras la ingesta de una comida normal (~40 mEq de K^+) el K^+ se absorbe por el tracto gastrointestinal y penetra en el líquido extracelular en minutos. La rápida entrada de K^+ a las células ayuda a mantener el balance hasta que los riñones puedan eliminar el exceso. Esto evita que la concentración de K^+ en el líquido extracelular se eleve a valores que podrían ser mortales (valores de referencia 3.5 - 5.0 mEq/L de K^+ en plasma). La internalización del K^+ en las células es rápida, eficiente y está regulada por hormonas, principalmente la aldosterona y la insulina (Goilav y Trachtman, 2010).

El incremento de la concentración de K^+ en el plasma estimula la secreción de insulina en el páncreas. Esta hormona estimula la entrada de K^+ a las células porque aumenta la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y/o del cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ a través de la SGK1, que regula positivamente su actividad (Lang et al., 2014). La acción de la insulina tiene lugar en una gran variedad de tipos celulares incluyendo musculo esquelético, hígado, células epiteliales, fibroblastos, adipocitos y eritrocitos (Lang y Vallon, 2012).

La excreción renal de K^+ es primordial en la respuesta a cambios en su ingesta y el mantenimiento de los niveles de K^+ sérico. En la región distal de la nefrona, especialmente en el túbulo conector y el conducto colector, el K^+ puede reabsorberse o secretarse dependiendo de las necesidades fisiológicas. (Boron 2009; Guyton y Hall, 2011).

Manejo renal del K^+

El mantenimiento de la homeostasis del K^+ requiere de un balance continuo entre la ingesta por la dieta y su excreción del organismo. En individuos con una función renal normal la mayor parte del K^+ de la dieta se excreta a través de la orina. El K^+

se filtra libremente en el glomérulo. En condiciones normales, alrededor del 50-70% del K^+ presente en el ultrafiltrado se reabsorbe en el túbulo proximal. Otro 20-30% del K^+ se reabsorbe en el asa de Henle, en especial en la porción gruesa ascendente, a través del cotransportador NKCC2. La carga de K^+ que se reabsorbe en estos segmentos de la nefrona es relativamente constante, de ahí que las variaciones diarias en la excreción de K^+ se deben a cambios en la secreción en los túbulos distal y colector (Goilav y Trachtman, 2010).

En la nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN; comprende la parte final del túbulo contorneado distal, el túbulo conector y el conducto colector), especialmente en el túbulo conector y el conducto colector, el K^+ puede reabsorberse o secretarse dependiendo de las necesidades del organismo. Ante una ingesta elevada de K^+ , la excreción extra requerida se consigue incrementando su secreción. Por el contrario, si la ingesta de K^+ es baja, su secreción en los túbulos distal y colector disminuye (Boron 2009; Guyton y Hall, 2011).

El TCN y el conducto colector están constituidos por células principales e intercaladas. Las células principales secretan K^+ y constituyen alrededor del 60% de las células epiteliales en la corteza renal. El K^+ pasa desde el intersticio al citoplasma a través de la ATPasa Na^+/K^+ presente en la membrana basolateral y sale al lumen por canales selectivos de K^+ (Figura 6) (Guyton y Hall, 2011).

En circunstancias asociadas a una pérdida acentuada de K^+ , se detiene su secreción y hay una reabsorción neta de K^+ a través de las células intercaladas. El mecanismo aún no se conoce del todo, sin embargo, se sugiere que el K^+ se reabsorbe por la ATPasa H^+/K^+ localizada en la membrana luminal y posteriormente pasa hacia el intersticio por canales selectivos de K^+ (Boron, 2009).

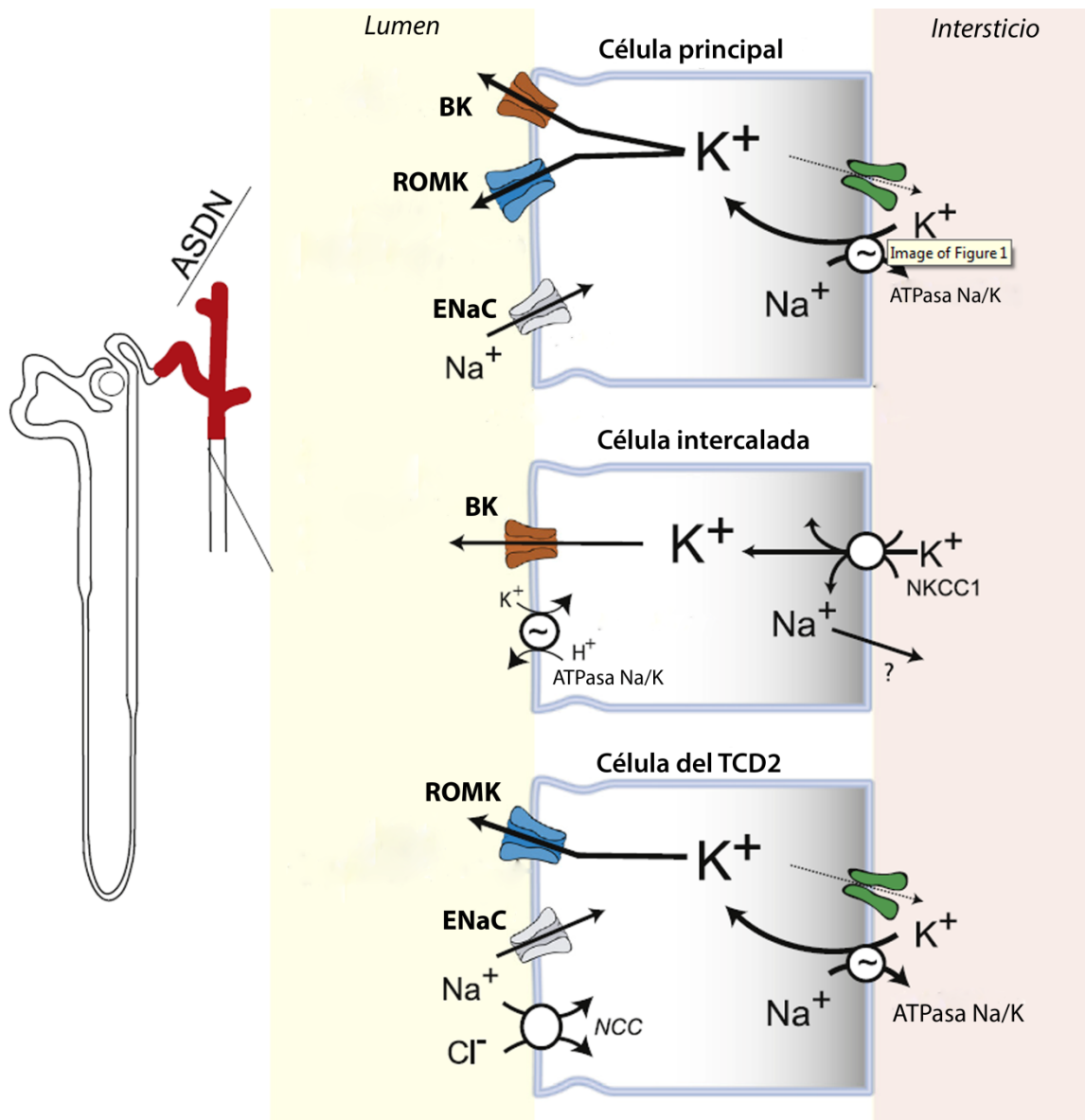


Figura 6. Secreción de K^+ en la ASDN (editada de Welling, 2013). Mecanismos de transporte celular para la secreción de K^+ en las células principales (TCN y CCC), células intercaladas y en células parecidas a las células principales en la región final del túbulo contorneado distal o TCD2

La aldosterona induce cambios sustanciales en el transporte transcelular de K^+ por ello tiene un papel primordial en la protección contra la hipercalemia. En particular, la aldosterona disminuye el porcentaje de K^+ total en el plasma e incrementa la cantidad intracelular de K^+ por la estimulación de la ATPasa Na^+/K^+ (Friedman, 1982; Weiner y Wingo, 1998).

Un incremento en la concentración plasmática de K^+ estimula la secreción de aldosterona en el riñón (Wang, 2004), que a su vez aumenta la expresión de la SGK1. Esta cinasa contribuye en la regulación de la retención renal de Na^+ y la eliminación renal de K^+ , ya que regula positivamente la expresión y actividad del canal epitelial de sodio (ENaC) y de los canales de potasio ROMK y Kv1.3, presentes en las membranas lumbales de las células principales del conducto colector (Wang y Giebisch, 2009; Koeppen y Stanton, 2009).

La cinasa SGK1 regula positivamente la actividad de ENaC al fosforilar una serina en el amino terminal de la subunidad α del canal (Diakov y Korbmacher, 2004). Además, inhibe por fosforilación a la ubiquitin ligasa Nedd4-2, involucrada en la degradación de ENaC, con lo que incrementa indirectamente la vida media del canal (Snyder et al., 2002). Por otro lado, la SGK1 estimula la transcripción de ENaC, gracias a que regula negativamente un factor de transcripción que mantiene la represión basal de expresión de la subunidad α del canal (Zhang et al., 2007).

En el caso del ROMK, la SGK1 incrementa su abundancia en la membrana plasmática (Yoo et al., 2003) a través de NHERF2, una proteína que media el tráfico de canales hacia la membrana (Palmada et al., 2003). Además SGK1 lo fosforila directamente y con ello introduce una carga negativa que desplaza su sensibilidad al pH hacia valores más ácidos. Esto último permite que la corriente a través del canal sea mayor al pH citosólico (Palmada et al., 2003). Por otro lado, SGK1 regula a la alta la actividad del Kv1.3 mediante la inhibición de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 (Henke et al., 2004).

El incremento en la expresión de las ATPasas Na^+/K^+ facilita la captación de K^+ a través de la membrana basolateral al interior de las células y, en consecuencia, eleva la concentración intracelular de K^+ . El aumento en el número y actividad de los canales ENaC eleva la entrada de Na^+ luminal al interior celular, esto despolariza el voltaje de la membrana apical. Lo anterior, aunado al incremento de la concentración intracelular de K^+ , eleva la fuerza conductora electroquímica para la secreción de K^+ hacia la orina (Koeppen y Stanton, 2009; Welling, 2013).

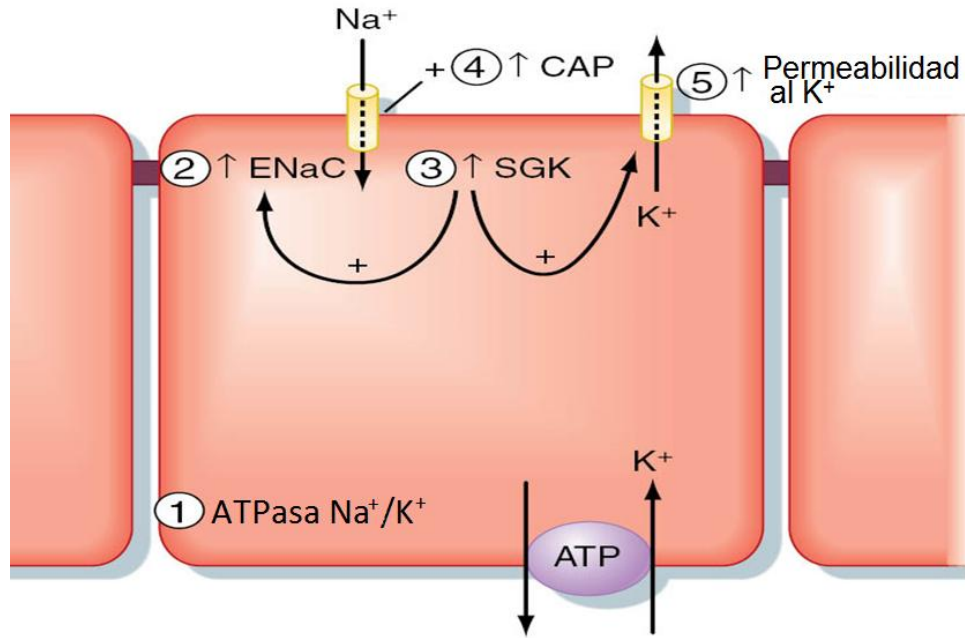


Figura 7. Efectos de la aldosterona en relación con la secreción de K⁺ por las células principales del túbulo colector (editada de Koeppen y Stanton, 2009). 1) Aumento de la cantidad de ATPasas Na⁺/K⁺ en la membrana basolateral; 2) incremento de la cantidad de canales de Na⁺ en la membrana apical; 3) aumento de los niveles de SGK1; 4) estimulación de CAP1 (proteína activadora de canal), que activa directamente a ENaC 5) estimulación de la permeabilidad de K⁺ en la membrana apical.

ANTECEDENTES

La actividad y función de los canales HCN ha sido ampliamente estudiada en tejidos excitables como el cerebro y el corazón. Se sabe que además de la unión a AMPc los HCN también se regulan por su interacción con diferentes moléculas, entre ellas proteínas cinasas como la tirosina cinasa Src, p38-MAPK, PKC, cGKII, entre otras (Biel et al., 2009; He et al., 2014). Sin embargo, su detección en tejidos no excitables, tales como el páncreas o el riñón, es relativamente reciente, por ello, su función y regulación en este tipo de tejidos no están dilucidadas del todo.

Recientemente en nuestro laboratorio se identificó a la familia de los canales HCN en la corteza y la médula del riñón de la rata y se observó que se expresan de manera diferencial a lo largo de la nefrona. En particular, el canal HCN2 se encuentra intracelular y en la membrana basolateral de las células principales e intercaladas (secretoras de ácido) del conducto colector (Figura 8). En estas últimas participa en el transporte transcelular del ion amonio (NH_4^+) en los epitelios renales (Carrisoza et al, 2011). Esto es importante en la regulación del pH sanguíneo al contribuir a la excreción neta de protones en la orina.

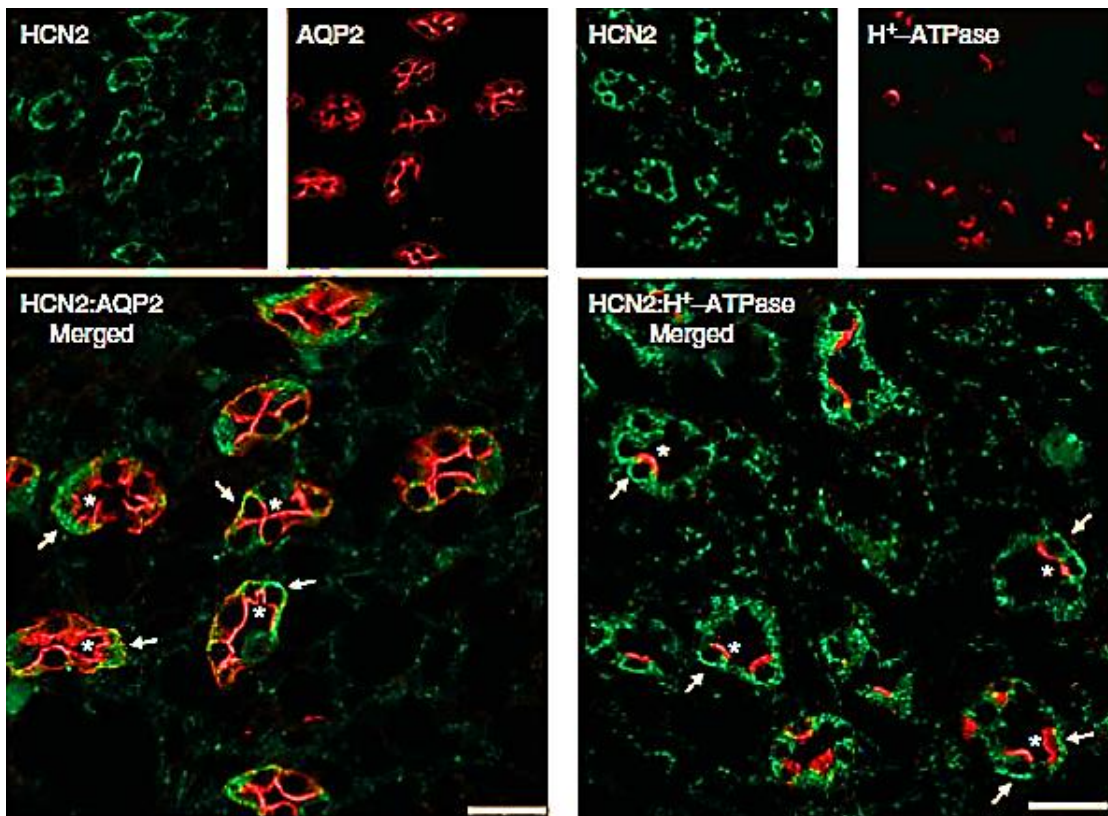


Figura 8. Inmunolocalización del canal HCN2 en células principales e intercaladas del conducto colector de la médula externa del riñón de la rata. Doble inmunofluorescencia etiquetada con anticuerpos dirigidos contra el canal HCN2 (secundario: Alexa 488; verde) y acuaporina 2 (AQP2; secundario: Alexa 594; rojo) o contra la subunidad B1 de la V-ATPasa (secundario: Alexa 594; rojo). Las células que expresan el canal HCN2 junto con la AQP2 o con la V-ATPasa se muestran en los paneles de abajo (empalme). La AQP2 y la V-ATPasa se observan en las membranas apicales (*), mientras que el HCN2 se observa en las membranas basolaterales (flechas). Escala= 25 μm (Carrisoza et al, 2011).

Por otra parte, se observó que el canal HCN4 se localiza en el túbulo proximal, en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, en la membrana apical de las células intercaladas del túbulo conector y el conducto colector cortical y medular.

En el riñón, el canal HCN4 (apical) se encuentra predominantemente en su forma proteolizada hacia el C-terminal (~95 y 70 kDa) (Datos no publicados); estos tamaños corresponden con los fragmentos truncados predichos por Calejo y colaboradores, de acuerdo con los probables sitios de escisión para metaloendopéptidasas en los aminoácidos Ser920 - Asp921 y Lys562 - Met563 (Calejo et al., 2014).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que, en los animales adaptados a una acidosis metabólica crónica, no se altera el nivel de proteína del canal de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ HCN2 (Carrisoza et al, 2011). Cambios en la concentración plasmática de K^+ afectan la producción renal de amonio (Tannen, 1977) y el incremento de la concentración plasmática de K^+ por arriba de 5.5 mEq/L conduce a una disminución de su excreción renal (DuBose y Good, 1991). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la dieta deficiente de K^+ y con alto contenido de K^+ sobre los niveles del canal HCN2 y HCN4 en el epitelio renal de la rata.

Encontramos que en las ratas adaptadas a una dieta crónica con alto contenido de K^+ (10%), los niveles proteicos del canal HCN2 aumentan (se regula a la alta) en la nefrona distal sensible a aldosterona. En contraste, el canal HCN4 se regula a la alta en la membrana apical de células α -intercaladas por la dieta deficiente de K^+ (Datos no publicados). Es posible que, en las células principales y/o intercaladas, la entrada de Na^+ a través de los HCN participe en la generación de la despolarización necesaria para la activación de los canales secretores de K^+ presentes en la membrana apical.

En consecuencia, se favorecería la excreción urinaria del exceso de K^+ en el intersticio de la médula renal. Además, la captación luminal de Na^+ por el HCN4 podría favorecer la reabsorción de NaHCO_3 por las células intercaladas. Si esto ocurre, es probable que los canales HCN2 y HCN4 se encuentren regulados por moléculas relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del K^+ . El canal HCN2 presenta en el carboxilo terminal la secuencia consenso RXRXX(S/T) que reconoce la SGK1 (Kobayashi y Cohen 1999); mientras que en el canal HCN4 dicha secuencia se encuentra en el amino terminal (Figura 9).

Durante la hipercalcemia se alteran tanto los niveles proteicos del HCN2 y HCN4 como la expresión de la cinasa SGK1 (Vallon et al, 2005; Koeppen y Stanton, 2009), que regula positivamente la actividad de muchos canales, esto podría implicar la participación de la SGK1 en alguno de los mecanismos de activación del canal. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la actividad de los canales de amonio/sodio HCN2 y HCN4 efectivamente está regulada por dicha cinasa.

Además, como se mencionó anteriormente, en el riñón se observan predominantemente las formas proteolizadas del canal HCN4, por ello, otro de los objetivos fue generar la proteína cortada hacia el C-terminal (HCN4-Δ921) para mimetizar la banda inmunodetectada en riñón de ~95 kDa y evaluar si es funcional.

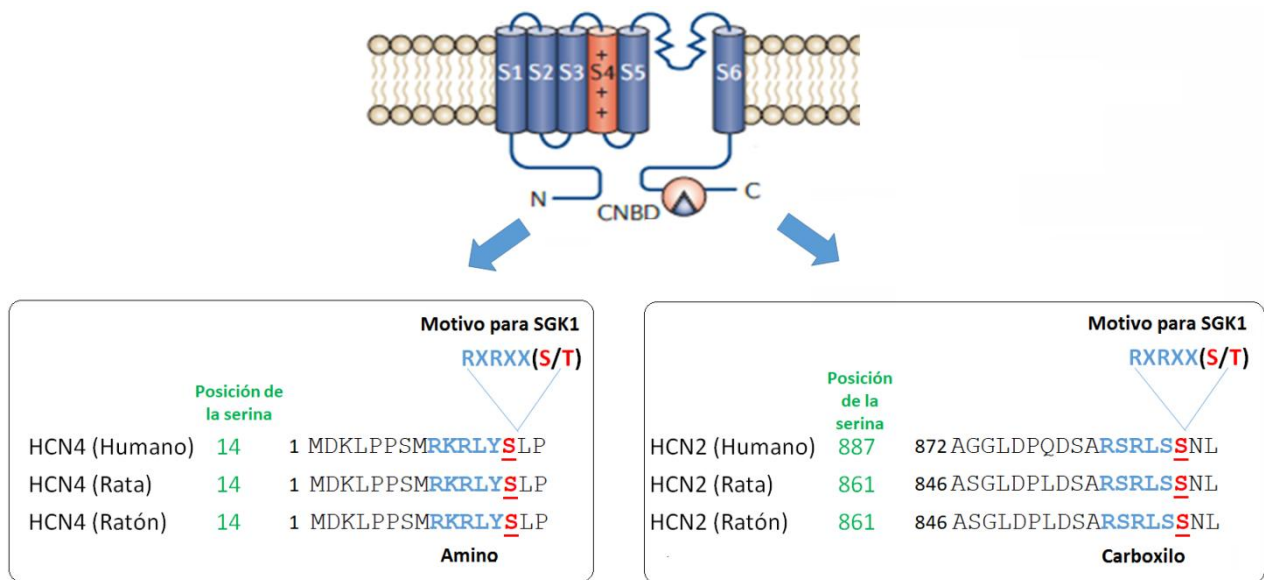


Figura 9. Posición de la secuencia consenso de fosforilación por SGK1 en las subunidades de los canales HCN2 y HCN4 (modificada de Postea y Biel, 2011).

OBJETIVO GENERAL

Co-expresar en ovocitos de *Xenopus laevis* los canales HCN2, HCN4 y HCN4- Δ 921 con la cinasa SGK1 para determinar si ésta última regula su actividad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el cDNA del canal HCN4- Δ 921 y amplificarlo para utilizarlo como templado para la síntesis del cRNA.
- Amplificar el cDNA de la cinasa SGK1 WT y la mutante inactiva SGK1 K127M para utilizarlo como templado para la síntesis del cRNA.
- Obtener el cRNA del canal HCN2, HCN4, HCN4- Δ 921 y de las cinasas SGK1 para inyectarlo en los ovocitos de *X. laevis*.
- Registrar la corriente del canal HCN2, HCN4 y HCN4- Δ 921 en ausencia y presencia de la cinasa SGK1 silvestre (SGK1 WT) y la mutante inactiva (SGK1^{K127M}) para determinar si se observa una diferencia significativa.

HIPÓTESIS

Si la cinasa SGK1 fosforila a los canales HCN2 y HCN4 entonces la corriente iónica producida por ellos aumentará.

MATERIALES Y MÉTODOS

Amplificación del cDNA de SGK1

Los DNAs complementarios (cDNA) de SGK1 WT, y SGK1 K127M (mutante inactiva) fueron donados por el Dr. Paul A. Welling, investigador del Departamento de Fisiología de la Universidad de Maryland, Baltimore. Para su amplificación se prepararon células competentes de *E. coli* DH5 α y se transformaron por choque térmico con los vectores SGK1WT-pSD64TF y SGK1K127M- pSD64TF.

Las bacterias se incubaron a 37°C en medio sólido Luria-Bertani (LB) con ampicilina durante 16 h. Después se tomaron colonias aisladas al azar y se incubaron en medio LB líquido (5 mL) con ampicilina durante 14 h a 37 °C. El DNA plasmídico de este cultivo se purificó con el Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN). La presencia del DNA se verificó en un gel de agarosa, posteriormente se realizó el corte con enzimas de restricción (Not I, Kpn I y Pst I) para corroborar el patrón de bandas, según el mapa de los vectores.

Después se obtuvieron los DNAs a mayor escala, en un cultivo líquido de medio LB con ampicilina (100 mL) utilizando el Plasmid Midiprep Kit (QIAGEN). Nuevamente se verificó la calidad del DNA mediante un gel de agarosa, se realizó el análisis de restricción y se cuantificó mediante espectrofotometría-UV por su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

Obtención del canal HCN4 y HCN4- Δ 921 en el vector PBF¹

El plásmido hHCN4/pcDNA3 (Donado por el Dr. Luis Vaca, UNAM) codifica para el marco de lectura abierto completo del canal HCN4 de humano, que consta de 3611 pb. Dicho plásmido se cortó con las enzimas de restricción EcoR I y Kpn I para obtener la primera mitad del cDNA del canal hHCN4; este fragmento de 1313 pb se purificó a partir de un gel de agarosa (1%) y se digirió de nuevo con estas

¹ Este procedimiento lo realizó la Maestra en Ciencias Carolina Salvador.

enzimas antes de la ligación. La segunda mitad tanto del canal HCN4 wt como del truncado se obtuvo mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Se diseñaron iniciadores basados en la homología de secuencia de aminoácidos con el canal HCN4 humano (GenBank Acc: NM_0054772). A cada cebador se le adicionó, en uno de los extremos, un sitio de corte para una enzima de restricción. Las secuencias de nucleótidos para los cebadores del canal silvestre hHCN4 fueron: (1) Kpn I 5'-GCTGCCTGCAGTTCCTGGTACCCATGCTACAGGACTT-3' (sentido) y (2) 5'-ATTTACCGGTTTCATAGATTGGATGGCAGTTTGGAGCGCAC-3' Age I (anti-sentido).

El canal HCN4 truncado hacia el carboxilo terminal (HCN4- Δ 921; codifica para los aminoácidos 1-921). Por lo tanto, se amplificó con el mismo cebador sentido usado para hHCN4 (1) y con el cebador antisentido: (3) 5'-ATTTACCGGTTTCAGGAGGAGGACAGGGAGCCACCCA-3' Age I. El fragmento, obtenido mediante PCR, del canal completo HCN4 fue de 2298 pb de longitud y el del HCN4- Δ 921 de 1450 pb.

Estos fragmentos se purificaron a partir de un gel de agarosa y se digirieron con las enzimas correspondientes (Kpn I y Age I) antes de la ligación. Los fragmentos del cDNA del canal HCN4 completo y HCN4- Δ 921 se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), se subclonaron en el vector pBF (para expresión en ovocitos) y se transformaron en células DH5- α . Los cDNAs purificados (Midiprep) se comprobaron por secuenciación (prisma ABI 310, Perkin Elmer).

Transcripción *in vitro*

Para la síntesis *in vitro* del cRNA: el cDNA del canal HCN2 insertado en el vector pSD64T se linealizó con la enzima de restricción Sal I, el cDNA del canal HCN4 (completo y truncado) con Pvu I y los cDNAs de SGK1 WT-pSD64TF y SGK1

K127M-pSD64TF se linealizaron con Bgl I. La digestión se corroboró por medio de un gel de agarosa.

Después, el cDNA se transcribió *in vitro* con la RNA polimerasa SP6 en presencia de ribonucleótidos y análogo de cap (m7G(5')ppp(5')G). Para ello, se utilizaron los reactivos del kit mMessage mMachine (Ambion) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El cDNA utilizado como templado se removió con DNAsa I libre de RNAsas. El cRNA se purificó por precipitación con cloruro de litio y su integridad se corroboró por electroforesis desnaturizante en gel de agarosa. El cRNA se cuantificó mediante espectrofotometría por su absorbancia a 260 nm.

Expresión de canales iónicos en los ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*

En 1971 Gurdon y colaboradores demostraron que los ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis* eran capaces de sintetizar hemoglobina después de la inyección del cRNA. Estos ovocitos se usan para la expresión de proteínas heterólogas gracias a su capacidad para traducir de manera eficiente mRNAs exógenos en proteínas funcionales (Gurdon et al., 1971). En 1982 Miledi y colaboradores demostraron que los ovocitos de *X. laevis* podían expresar diferentes canales iónicos (Miledi et al., 1982). Con el tiempo los ovocitos se convirtieron en el sistema más utilizado para el análisis electrofisiológico de canales, receptores y transportadores.

Los estudios electrofisiológicos que emplean ovocitos incluyen: 1) análisis de las propiedades de permeabilidad de los canales y sensibilidad farmacológica, 2) investigación de la propiedades de subunidades mutantes para abordar problemas de estructura-función, 3) análisis de modificaciones postraduccionales, 4) estudio de la regulación del canal por otras proteínas y segundos mensajeros (Bianchi y Driscoll, 2006).

Los ovocitos son óvulos inmaduros que atraviesan por seis estadios de maduración (I-VI) clasificados según su tamaño y apariencia (Dumont, 1972). Para la mayoría de los experimentos se utilizan los ovocitos en los estadios V-VI (Figura 10) debido a que son grandes (1-1.3 mm de diámetro). Su tamaño facilita su manejo, la inyección del cRNA y la inserción de los microelectrodos. La tasa de maduración de los ovocitos está influenciada por diferentes factores tales como la alimentación, la estimulación hormonal y la temporada. Por ello, varían en tamaño, apariencia y metabolismo. Por lo tanto, se debe tener cuidado de utilizar ovocitos de la misma etapa o etapas cercanas (Wagner et al., 2000).



Figura 10. Ovocitos de *Xenopus laevis* en las fases de maduración V y VI. En estas fases tienen un diámetro aproximado de 1-1.3 mm y presentan una región pigmentada café (polo animal) y una región no pigmentada (polo vegetal).

Obtención y microinyección de ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos se obtuvieron por ovariectomía parcial de ranas adultas *Xenopus laevis* (*Xenopus I*) anestesiadas por inmersión en etil 3-aminobenzoato (Sigma) al 0.2%, pH 7.4. Los agregados se separaron manualmente de los lóbulos ováricos y se incubaron en medio ND96 libre de calcio con colagenasa tipo 1A (2 mg/mL; Sigma) durante 40 minutos a temperatura ambiente para remover la capa folicular.

Posteriormente se realizaron varios lavados con medio ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM, piruvato 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM, pH 7.4) y se incubaron durante la noche a 18 °C en medio ND96 con gentamicina. Al día

siguiente se inyectaron los ovocitos de las fases V y VI con el cRNA correspondiente en un volumen total de 50 nL y se incubaron a 18 °C por 24-72 h.

Registro electrofisiológico

Uno a tres días después de la inyección del cRNA, los ovocitos se registraron con la técnica de fijación del voltaje con dos microelectrodos (Stühmer y Parekh, 1995) como control se registraron ovocitos del mismo lote inyectados con el cRNA de SGK1 WT. Se utilizó un convertidor analógico digital DIGIDATA 1322A, un amplificador Geneclamp 500B, el software pClamp 8.0 (todos de Axon Instruments Inc.) y una PC Pentium III (Intel) para la adquisición de los registros.

Las corrientes macroscópicas para el canal Kv1.3 se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de voltaje de -60 a +80 mV con pulsos de 2 segundos e incrementos de 20 mV, con un potencial de mantenimiento de -90 mV. Para el canal HCN2 se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de -120 a -60 mV con pulsos de 3 segundos e incrementos de 20 mV, con un potencial de mantenimiento de -35 mV, mientras que para el canal HCN4 se obtuvieron a partir de -150 a -60 mV con pulsos de 4 segundos e incrementos de 10 mV y un potencial de mantenimiento de -40 mV.

Para realizar los experimentos se usó ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM, piruvato 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM, pH 7.4) como medio de registro. Las pipetas de registro se llenaron con una solución 3M de KCl. La amplitud normalizada de las corrientes de cola se graficó en función del potencial de prueba, los resultados se ajustaron a la ecuación de Boltzmann para determinar el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$).

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en diferentes lotes de ovocitos. El análisis de los datos se hizo con los paquetes pClamp 8 (Axon Inc.) y Origin 7.5 (Origin lab. Corporation, EUA). Las curvas de la corriente (I en μA) contra el voltaje (V en mV) muestran los valores promedio y el error estándar de la media (EEM) de un número (n) de ovocitos individuales pertenecientes a un mismo lote. Las diferencias entre las medias se definieron con un análisis de varianza (ANOVA) o una Prueba T (según el número de grupos a comparar) y sólo los resultados con $P < 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Amplificación del cDNA

Se amplificó el DNA de SGK1 WT y SGK1 K127M (mutante inactiva). Las muestras se purificaron con un kit Miniprep (QIAGEN). Una vez que se confirmó la integridad del DNA y se realizó el análisis de restricción se inoculó un cultivo de mayor volumen para purificar el DNA en cantidad suficiente para los experimentos posteriores, con un Kit Midiprep (QIAGEN).

El corte con endonucleasas se efectuó para corroborar que el patrón de bandas obtenido correspondía con el esperado de acuerdo al mapa de restricción de cada construcción de SGK1. Para ello se realizó una doble digestión al DNA de SGK1 WT con las enzimas Not I y Kpn I, mientras que el DNA correspondiente a SGK1 K127M se cortó únicamente con la enzima Pst I (Figura 11).

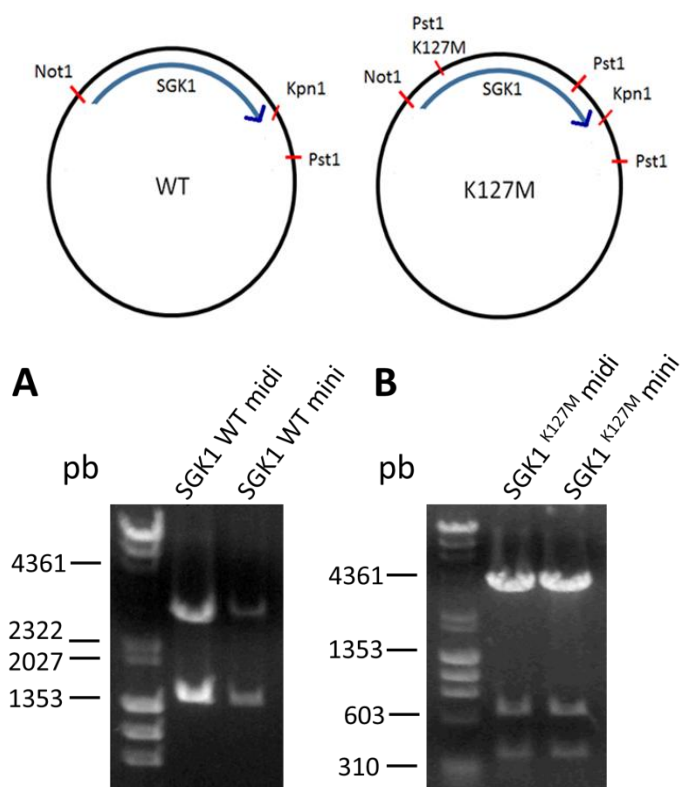


Figura 11. Geles de agarosa donde se muestra la digestión enzimática del DNA obtenido con ambos kits de purificación (Miniprep y Midiprep. A) Muestra el DNA de SGK1 WT, digerido con las enzimas de restricción Not I y Kpn I. B) Muestra el DNA de SGK1 K127M (mutante inactiva) digerido con la enzima Pst I.

Obtención del canal HCN4 y HCN4-Δ921 en el vector PBF.

Debido a la abundancia del canal HCN4 truncado en el riñón de la rata, se obtuvo mediante biología molecular el cDNA del canal cortado hacia el C-terminal (HCN4-Δ921; Met1-Ser920). El cDNA del canal HCN4-Δ921 genera una proteína de ~95 kDa que mimetiza al canal HCN4 proteolizado que se detectó en riñón con un anticuerpo dirigido contra el amino terminal del canal.

El cDNA del canal HCN4 y HCN4-Δ921 se obtuvo a partir del cDNA que codifica para el canal completo incorporado en el vector pcDNA3 (Figura 12). Para ello se obtuvo la primera parte mediante la digestión con enzimas de restricción; la segunda parte se obtuvo gracias a la amplificación por PCR con iniciadores específicos.

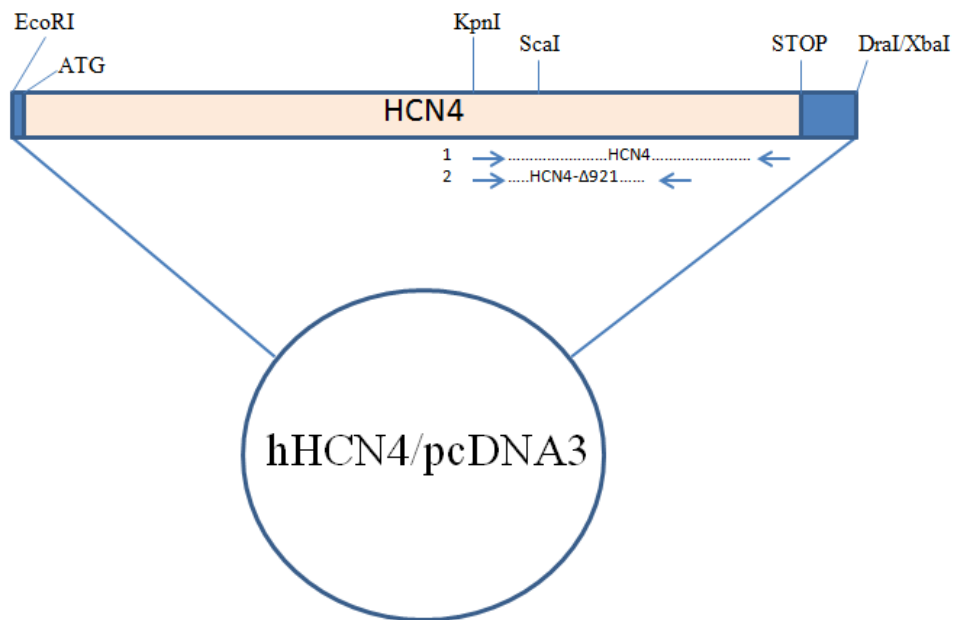


Figura 12. Esquema simplificado del plásmido hHCN4/pcDNA3. Se muestran las posiciones relativas de los sitios de corte utilizados para la obtención del cDNA de los canales HCN4 y HCN4-Δ921 y su posterior ligación al vector PBF (para expresión en ovocitos). Adicionalmente se ejemplifican las posiciones relativas de los iniciadores (flechas azules) utilizados para la amplificación de la segunda mitad del canal HCN4 completo (1) y HCN4-Δ921 (2).

Para la obtención de la segunda parte se realizó una PCR utilizando los iniciadores correspondientes para cada cDNA (HCN4 y HCN4-Δ921). A cada uno

se le agregó los sitios de corte necesarios para ligar al vector PBF. Cada reacción se realizó por tetraplicado para obtener DNA suficiente para la ligación. Para ello, primero se corroboró que el fragmento tuviera el tamaño esperado: 2300 pb para HCN4 y 1450 pb para HCN4- Δ 921 (Figura 13).

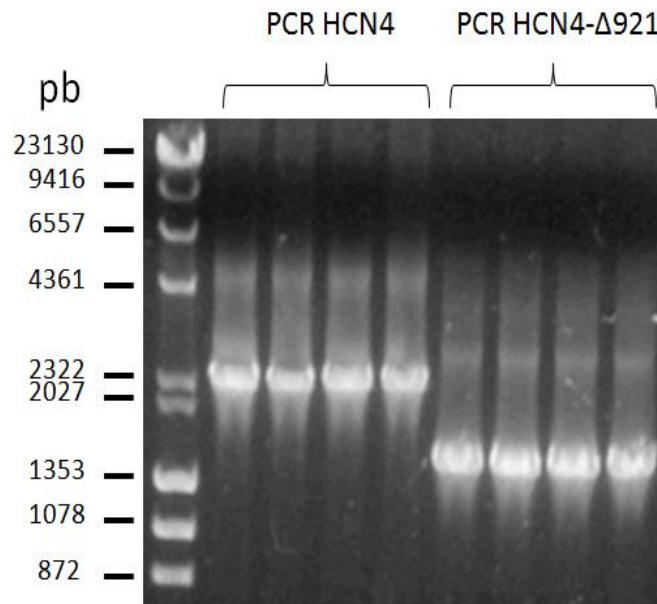


Figura 13. Gel de agarosa donde se muestran los fragmentos de DNA obtenidos por PCR.

Una vez que se comprobó que el tamaño de los fragmentos de PCR era el esperado para cada reacción, se procedió a cortarlos con las enzimas de restricción Kpn I y Age I. Como ya se había mencionado, la primera mitad se obtuvo por digestión del vector hHCN4/pcDNA3 con las enzimas EcoR I y Kpn I (~1300 pb). Ambas mitades se ligaron con el vector PBF previamente digerido con las enzimas EcoR I y Age I (~3000 pb). Cada reacción de ligación se realizó por triplicado.

Posteriormente, el DNA obtenido se transformó en células competentes DH5 α para la amplificación. Por último, se purificó y se corroboró mediante digestión que se hubiese incorporado en el sentido correcto. Las construcciones de ambos canales (hHCN4/PBF y hHCN4- Δ 921/PBF) se cortaron con las enzimas de restricción

EcoR I y Sca I. Si la ligación había ocurrido como se esperaba se debían observar bandas de ~3550, ~1750 y ~1300 pb para el canal HCN4/PBF y ~2700, ~1750 y ~1300 pb para el canal hHCN4- Δ 921/PBF.

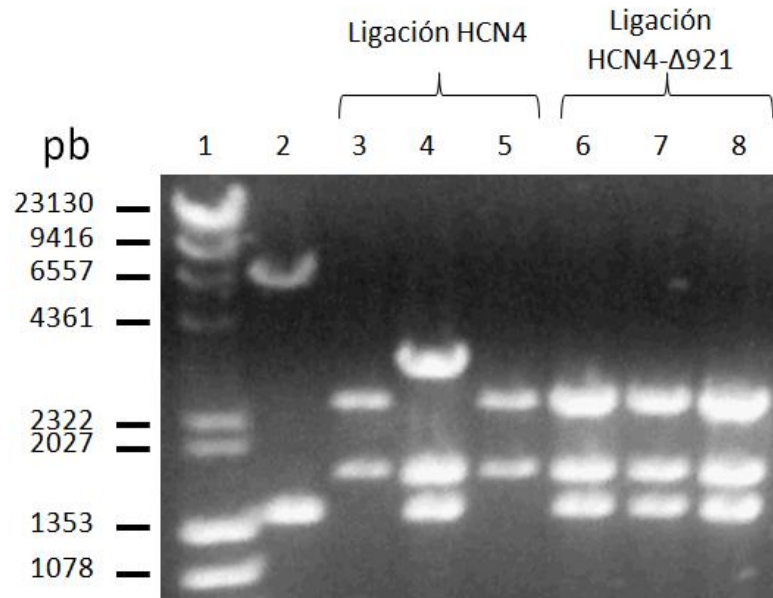


Figura 14. Gel de agarosa donde se muestra la digestión enzimática del DNA obtenido de las reacciones de ligación. El pozo 2 muestra la digestión del vector HCN4/pcDNA3 con las enzimas EcoR I y Sca I como control. Los pozos 3, 4 y 5 muestran el cDNA del canal HCN4, digerido con EcoR I y Sca I; los pozos 6, 7 y 8 muestran el DNA del canal HCN4- Δ 921 digerido con las mismas enzimas.

Como se puede observar en la figura 14, para el canal HCN4 únicamente en una de las reacciones de ligación se obtuvo el patrón esperado (pozo 4), mientras que para el canal HCN4- Δ 921 se observó el patrón esperado en las tres reacciones (pozos 6-8). El DNA que se ligó correctamente (según el patrón de bandas) se amplificó y purificó a mayor escala, posteriormente se comprobó por secuenciación.

Transcripción *in vitro*

Se transcribió el DNA de los canales HCN2, HCN4, HCN4- Δ 921 y Kv1.3 junto con el de las cinasas SGK1 WT y K127M. Se determinó la concentración del DNA por el valor de absorbancia a 260 nm y en un gel de agarosa se corroboró su integridad (Figura 15).

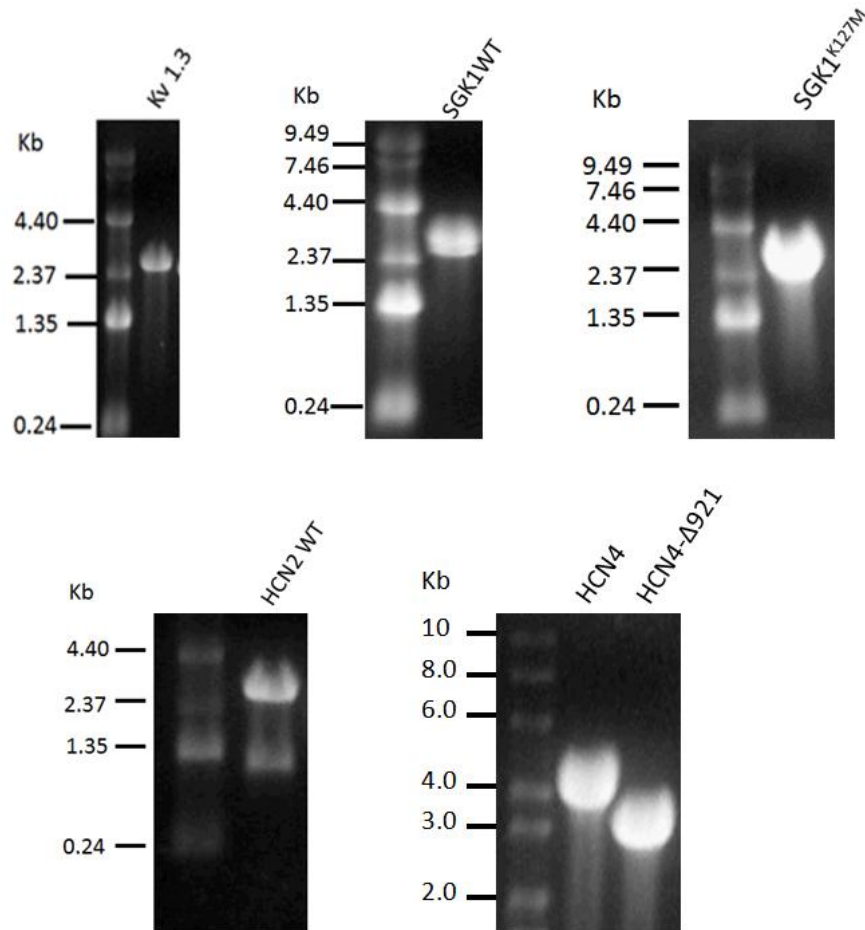


Figura 15. Geles de agarosa/formaldehído al 1% que muestra los cRNAs del canal Kv1.3, de la cinasa SGK1 (WT y K127M), del canal HCN2, HCN4 y HCN4- Δ 921.

Efecto de SGK1 sobre el canal Kv1.3 (control positivo)

En la literatura está reportado el efecto de la cinasa SGK1 sobre diferentes canales como el Kv1.3 (Henke et al., 2004), Kv1.5 (Boehmer et al., 2008), entre otros; por ello, una vez que se corroboró la integridad de los cRNAs, se comprobó el efecto de la SGK1 WT sobre el canal Kv1.3 como un control positivo de la expresión y actividad de la SGK1.

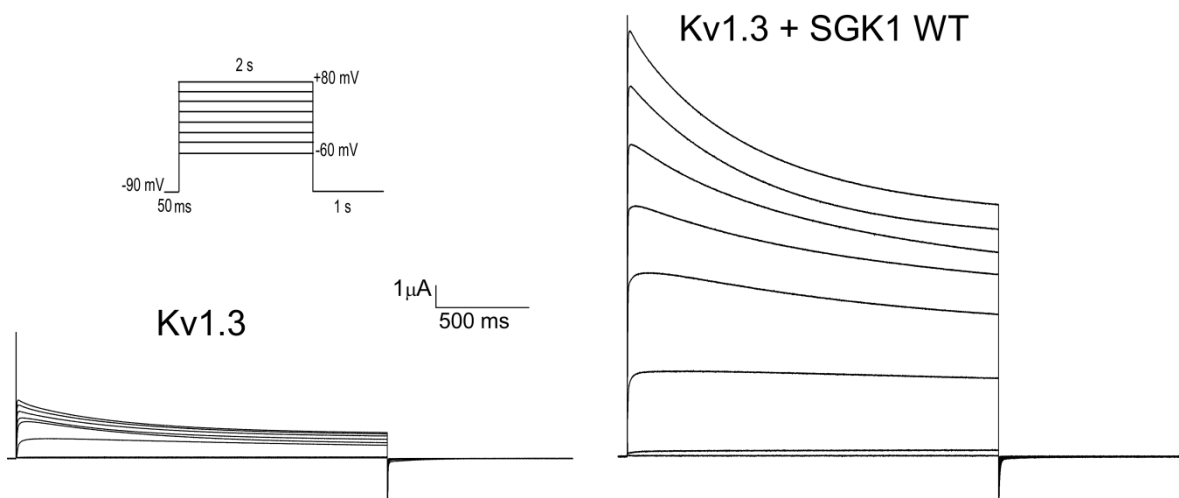


Figura 16. Trazos representativos de las corrientes de los ovocitos inyectados con 0.8 ng del cRNA del canal Kv1.3 y de ovocitos coinyectados con 0.8 ng del canal Kv1.3 más 8.5 ng de SGK1 WT. (n=6-12 ovocitos).

Se confirmó el efecto previamente reportado (Wärntges et al., 2002; Henke et al., 2004) de que la SGK1 regula a la alta al canal Kv1.3 (Figura 16). Sin embargo, la corriente generada en los ovocitos coinyectados con la SGK1 WT fue muy alta y produjo daño en la membrana del ovocito, esto dificultó el registro de las corrientes.

Para corroborar el efecto de la cinasa SGK1 WT sobre el canal Kv1.3 (humano) en un número mayor de ovocitos, se disminuyó la cantidad de SGK1 WT coinyectada con el canal. Se probaron 5 ng y 2.5 ng de cRNA de SGK1; con 5 ng del cRNA de SGK1 WT se observó un incremento significativo de la corriente producida por el

canal sin que éste llegara a dañar la membrana. Además se co-expresó al canal con la mutante inactiva SGK1 K127M para corroborar que el efecto requiere del sitio catalítico de SGK1 (Figura 17).

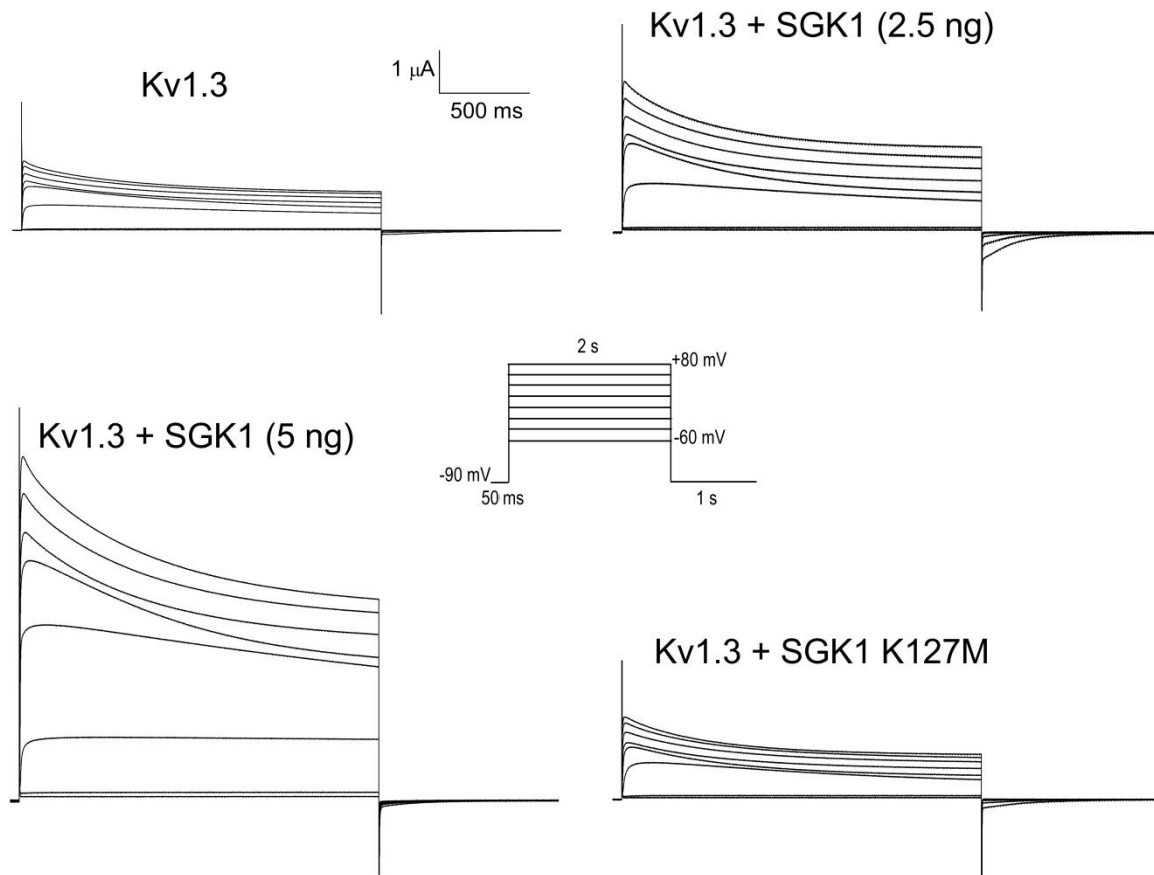


Figura 17. Trazos representativos de las corrientes de los ovocitos inyectados con el cRNA del canal Kv 1.3 (0.8 ng) solo o coinyectado con el cRNA de la SGK1 WT (2.5 y 5 ng) o con la SGK1 K127M (10 ng). n=7-15 ovocitos.

En otro experimento se confirmaron los resultados obtenidos y se probó el efecto de la expresión de la cinasa SGK1 WT, sobre la corriente endógena del ovocito como control negativo. La expresión de SGK1 WT no produjo cambio en la corriente observada (Figura 18 A). Por otra parte, el nivel de corriente del canal Kv1.3 aumentó ~3.4 veces en presencia de la SGK1 WT (Figura 18). No hubo diferencias significativas entre el nivel de corriente del canal Kv1.3 solo o

coexpresado con la SGK1 K127M, confirmando que el efecto de la SGK1 sobre el canal depende de su actividad de cinasa, tal como lo reportaron Henke y colaboradores (Henke et al., 2004).

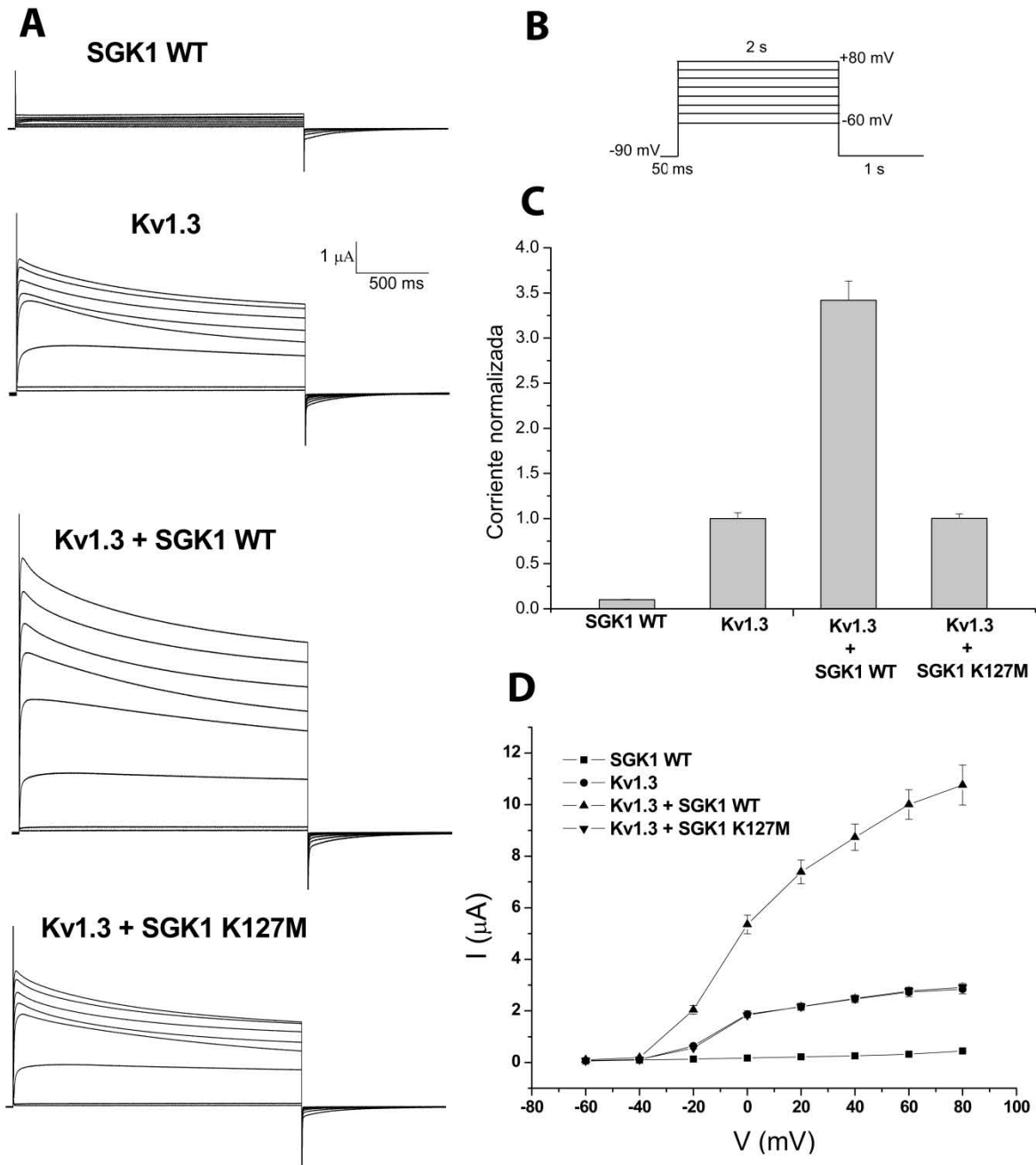


Figura 18. Efecto de la cinasa inducible por suero y glucocorticoides SGK1 sobre el canal Kv1.3. A: trazos representativos de las corrientes de los ovocitos inyectados con el cRNA de SGK1 (n=20), del canal Kv1.3 (n=19) o del Kv1.3 coinyectado con el cRNA de SGK1 WT (n=23) o de

SGK1 K127M (n=23). **B:** Protocolo de pulsos utilizado para la obtención de los registros. **C:** Media normalizada del valor de las corrientes al pico seguidas de un cambio de -95 a +20 mV. **D:** Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados. Las medias aritméticas \pm el EEM de las corrientes se normalizaron en cada lote de ovocitos con el valor de la media obtenida en los ovocitos que expresan únicamente al canal.

Co-expresión de la cinasa SGK1 con el canal HCN2

Una vez que se estableció que 5 ng de cRNA de SGK1 WT es una cantidad suficiente para la síntesis de la proteína y la observación del efecto sobre sus blancos, se procedió a co-inyectar el canal HCN2 con 5 ng de SGK1 WT; sin embargo no hubo diferencia significativa entre los ovocitos inyectados únicamente con el canal y los co-inyectados con SGK1 WT.

En la literatura está reportado que, al igual que ocurre con otras cinasas, el aumento de la cantidad del cRNA de la SGK1 que se inyecta está relacionado con un incremento en el efecto observado sobre sus blancos (Henke et al., 2004), tal como lo observamos con nuestro control positivo Kv1.3 (Figura 17). También, se ha observado que una disminución en la cantidad del canal y, por ende, en la corriente generada por éste, favorece la observación del efecto producido por la SGK1 (Baltaev et al., 2005).

Por lo anterior, se realizaron más experimentos en los que se disminuyó al mínimo la cantidad inyectada del canal y se incrementó la cantidad de SGK1 WT (Figura 19). En todos los experimentos posteriores se obtuvieron resultados similares, es decir, no hubo diferencia significativa entre los ovocitos inyectados únicamente con el canal y los coinyectados con SGK1 WT.

La cantidad mínima del cRNA de HCN2 que pudo registrarse electrofisiológicamente fue 0.5 ng y no se observaron cambios aun cuando se inyectó una cantidad elevada de la SGK1 (Figura 19 D). Como podemos ver en la figura 20, no sólo no observamos el incremento que esperábamos en la amplitud de la corriente total generada por el canal en presencia de la SGK1, sino que tampoco se aprecia un cambio significativo en la cinética o dependencia del voltaje (Figura 20 C).

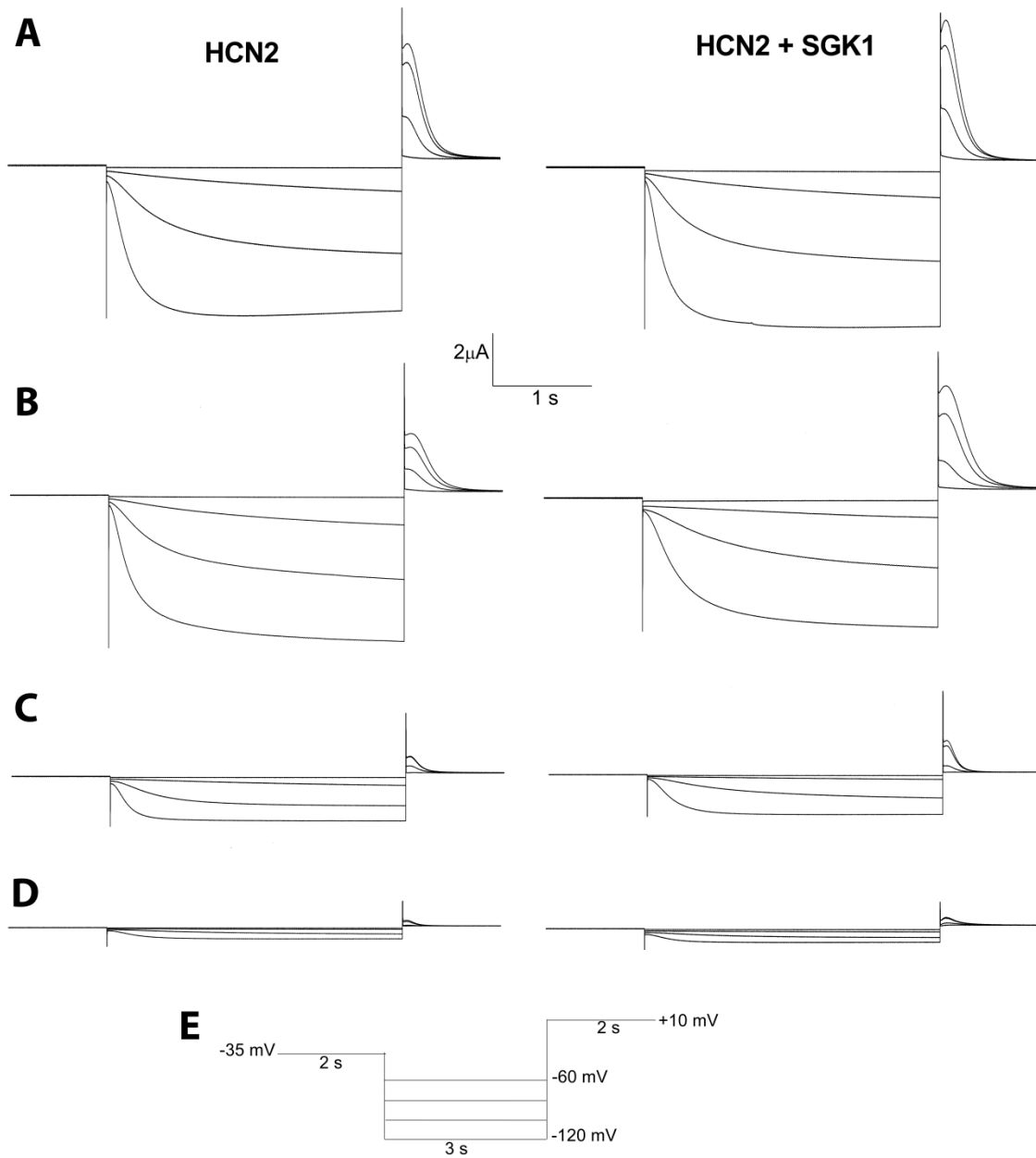


Figura 19. Efecto de la disminución del cRNA del canal HCN2 y del incremento de SGK1 WT. Trazos representativos de las corrientes producidas por el canal HCN2 en presencia y ausencia de SGK1 WT. A: HCN2 3.5 ng y SGK1 WT 5 ng B: HCN2 3.5 ng y SGK1 WT 8 ng C: HCN2 1 ng y SGK1 WT 10 ng D: HCN2 0.5 ng y SGK1 WT 15 ng. n=15-20 ovocitos por grupo. E: Protocolo de pulsos utilizado para la obtención de los registros; por cuestiones de espacio sólo se muestra lo correspondiente a 1 s (en lugar de 2) del trazo generado a -35 y +10 mV.

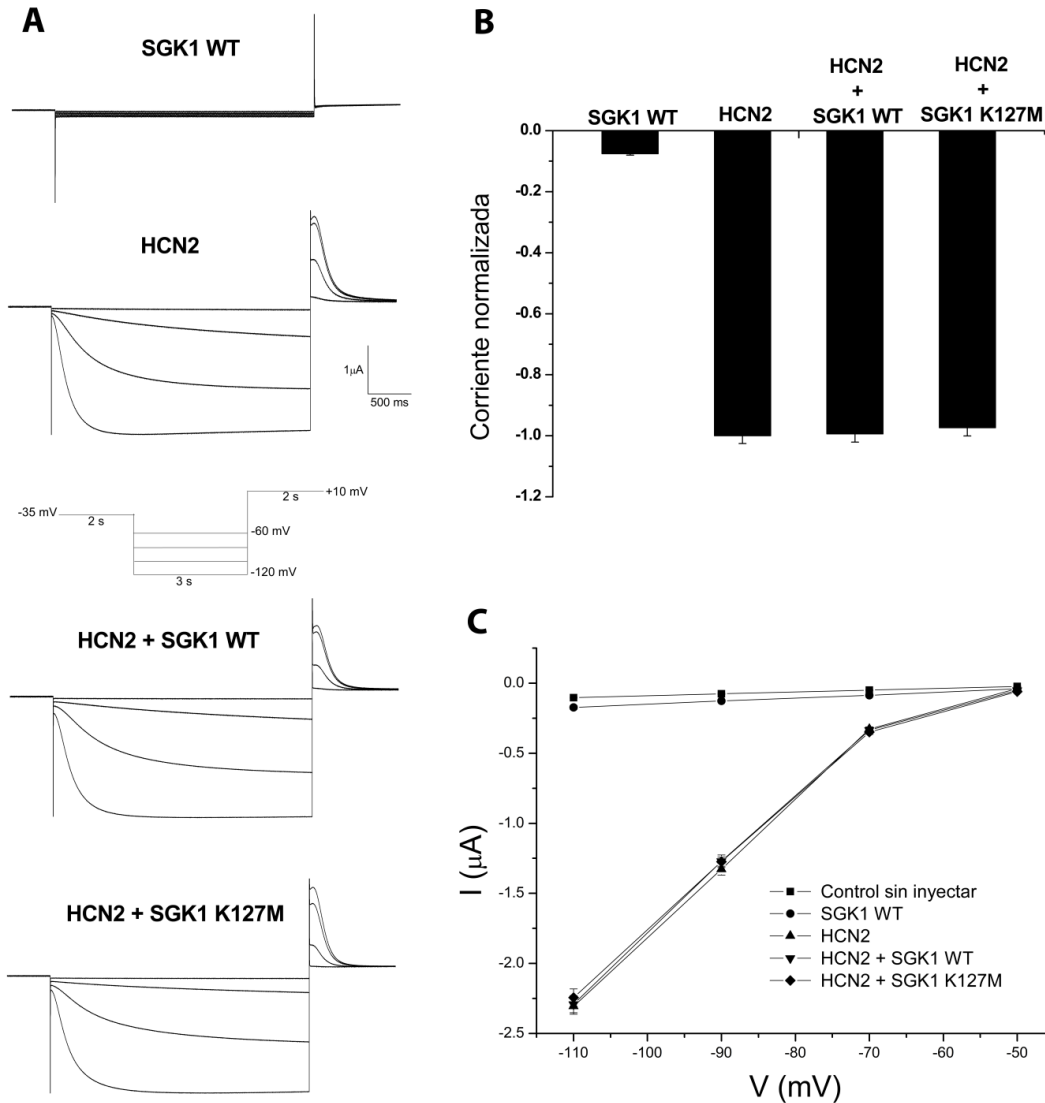


Figura 20. La cinasa inducible por suero y glucocorticoides SGK1 no afecta las corrientes del canal iónico HCN2 en ovocitos de *Xenopus laevis*. **A:** trazos representativos de las corrientes de los ovocitos inyectados con el cRNA de SGK1 (n=25), del canal HCN2 (n=27) o del HCN2 coinyectado con el cRNA de la SGK1 WT (n=27) o de la SGK1 K127M (n=26). **B:** Media normalizada del valor de las corrientes al pico seguidas de un cambio de -35 a -120 mV. **C:** Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados. Las medias aritméticas \pm el EEM de las corrientes se normalizaron en cada lote de ovocitos con el valor de la media obtenida en los ovocitos que expresan únicamente el HCN2. El valor de las medias después de la normalización es positivo, sin embargo, se graficó como negativo por pertenecer a una corriente entrante.

Efecto de la cinasa SGK1 sobre los canales HCN4 y HCN4- Δ 921

Los canales HCN4 y HCN4- Δ 921 se expresaron en los ovocitos de *Xenopus laevis* con el fin de evidenciar si el canal truncado (HCN4- Δ 921), correspondiente a la banda de ~95 kDa observada en el riñón, llega a la membrana y es funcional.

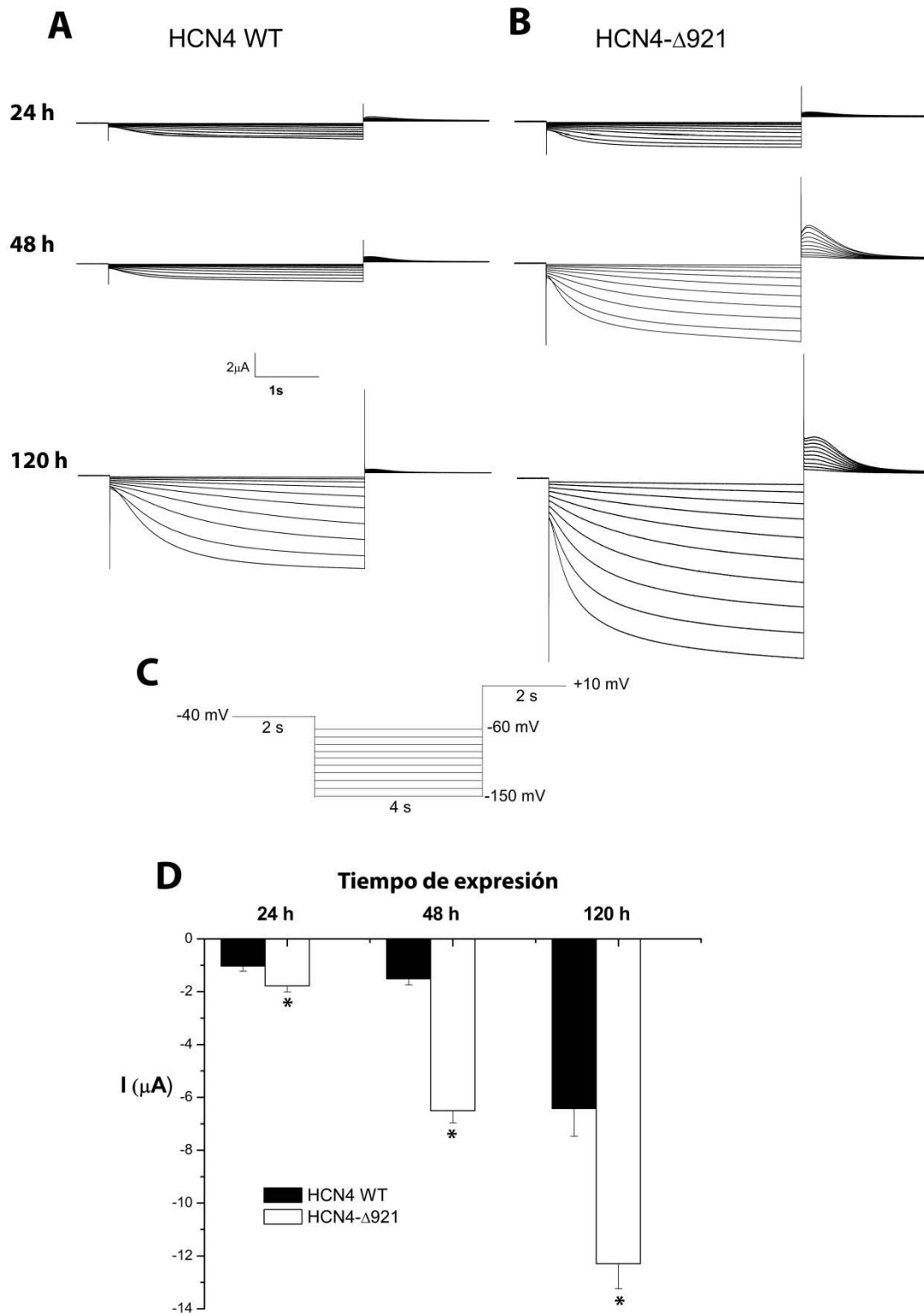


Figura 21. Expresión funcional del canal HCN4 silvestre (HCN4 WT) y HCN4- Δ 921 en ovocitos de *Xenopus laevis*. Trazos representativos de las corrientes registradas 24, 48 y 120 h después de la inyección del cRNA (30 ng) del canal **(A)** HCN4wt y del canal **(B)** HCN4- Δ 921. Después de 120 h, la corriente máxima a -150 mV fue -6.4 μ A para el canal HCN4 wt y -12.2 μ A para el HCN4- Δ 921. **(C)** Protocolo de pulsos de voltaje; por cuestiones de espacio sólo se muestran 500 ms (en lugar de 2 s) del trazo generado a -40 mV. **(D)** Valor de las corrientes al pico

seguidas de un cambio de -40 a -150 mV. Las barras muestran la media \pm el EEM, n=10-12 ovocitos por prueba, *p<0.01.

Se observó que tanto el canal HCN4 como el HCN4- Δ 921 son funcionales (Figura 21); sin embargo, la corriente observada para el canal HCN4- Δ 921 fue mayor, comparada con el canal HCN4 WT, mientras que el $V_{1/2}$ no se ve afectado (Figura 22). La corriente observada para el canal HCN4- Δ 921 fue 3.3 veces mayor con respecto al HCN4 WT a las 48 h, mientras que a las 120 h fue aproximadamente el doble. Aun considerando que se inyectó \sim 0.3 veces más moléculas del canal HCN4- Δ 921 que del HCN4 WT (debido a la diferencia en el tamaño) el incremento sigue siendo significativo.

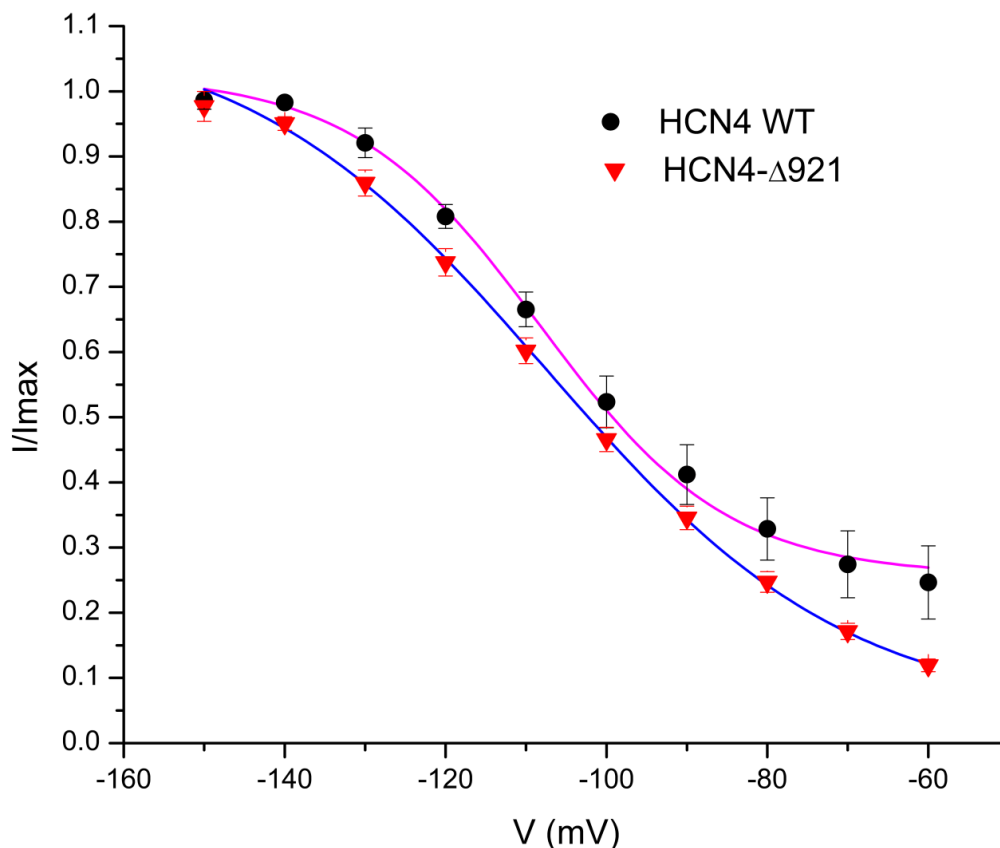


Figura 22. El $V_{1/2}$ de activación del canal HCN4 no se altera por la ausencia de los últimos 282 aminoácidos. Curvas de activación de los canales HCN4 y HCN4- Δ 921. Las amplitudes de las corrientes de cola normalizadas se trazaron en función del voltaje de pre-pulso del protocolo y se ajustaron a la ecuación de Boltzmann (líneas rosa y azul). El $V_{1/2}$ fue -108.9 ± 1.94 mV para el canal HCN4 WT y -107.5 ± 1.7 mV para el HCN4- Δ 921. n=8.

Posteriormente, ambos se co-expresaron con la cinasa SGK1WT para evidenciar si ésta tenía algún efecto sobre la actividad de los canales. Observamos que el nivel de corriente del canal HCN4 WT no se modificó por efecto de la SGK1 WT; por el contrario, el nivel de corriente del canal HCN4-Δ921 disminuyó significativamente (~37%) en presencia de SGK1 WT (Figura 23).

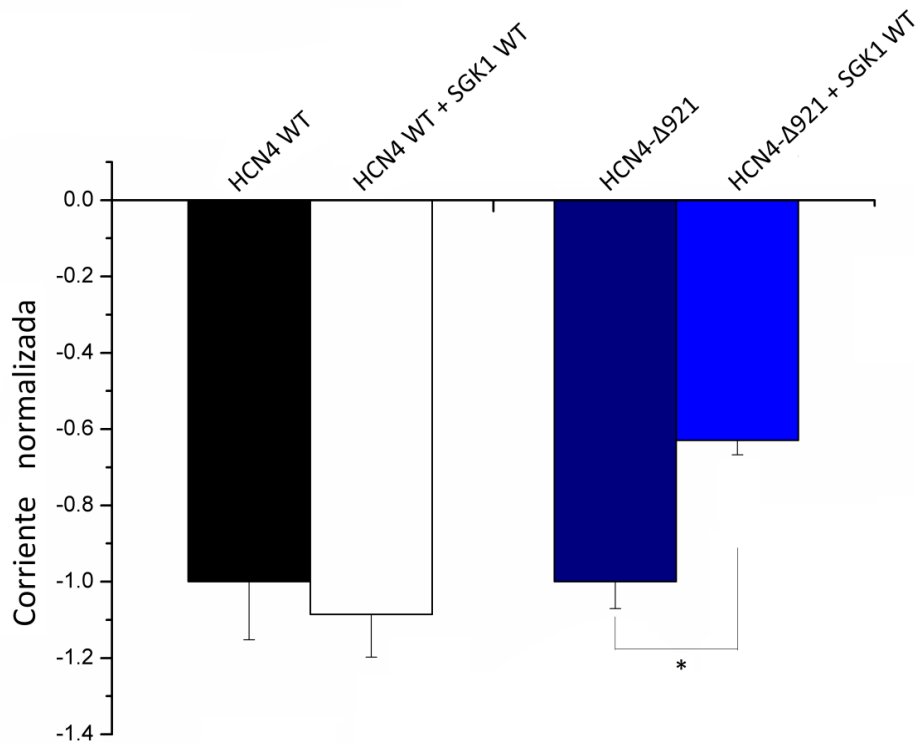


Figura 23. Efecto de la cinasa SGK1 sobre el canal HCN4 silvestre (HCN4 WT) y HCN4-Δ921 en ovocitos de *Xenopus laevis*. Valor de las corrientes al pico normalizadas seguidas de un cambio de -40 a -150 mV. Las medias aritméticas \pm el EEM de las corrientes se normalizaron en cada lote de ovocitos con el valor de la media obtenida en los ovocitos que expresan únicamente el canal HCN4 o HCN4-Δ921 según corresponda. n= 9-12 ovocitos por prueba, *p<0.01. El valor de las medias después de la normalización es positivo, sin embargo, se graficó como negativo por pertenecer a una corriente entrante.

Para identificar si el efecto observado sobre el canal HCN4-Δ921 depende de la subunidad catalítica de la SGK1, se procedió a co-expresarla con la mutante inactiva (SGK1 K127M); llama la atención que, también disminuyó en forma significativa la corriente producida por el canal en presencia de la cinasa inactiva (Figura 24).

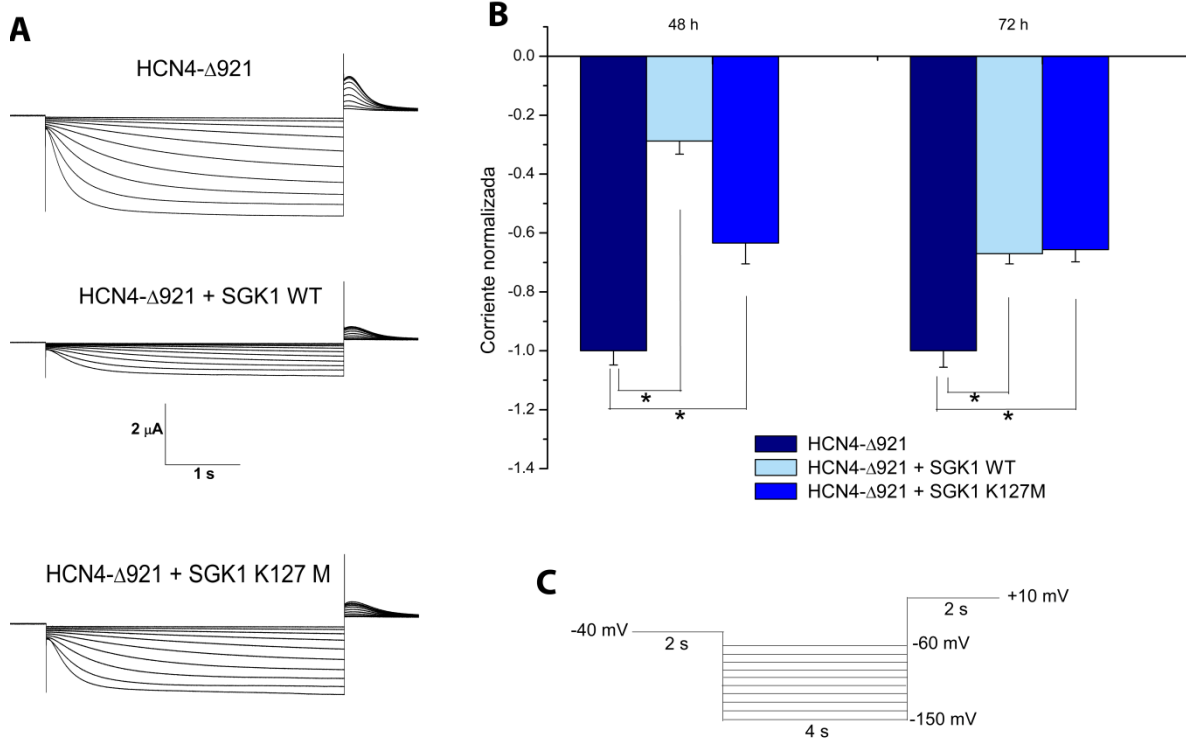


Figura 24. Efecto de la cinasa inducible por suero y glucocorticoides sobre el canal HCN4-Δ921 en ovocitos de *Xenopus laevis*. **A:** trazos representativos de las corrientes de los ovocitos inyectados con el cRNA del canal HCN4-Δ921 (40 ng) solo o coinyectado con la cinasa SGK1 WT (10 ng) o SGK1 K127 (10 ng). **B:** Valor de las corrientes al pico normalizadas seguidas de un cambio de -40 a -150 mV. Las medias aritméticas \pm el EEM de las corrientes se normalizaron en cada lote de ovocitos con el valor de la media obtenida en los ovocitos que expresan únicamente el canal HCN4 o HCN4-Δ921 según corresponda. $n=10-18$ ovocitos por prueba, $*p<0.01$. El valor de las medias después de la normalización es positivo, sin embargo, se graficó como negativo por pertenecer a una corriente entrante. **C:** Protocolo de pulsos de voltaje. Por cuestiones de espacio sólo se muestran 500 ms (en lugar de 2 s) del trazo generado a -40 mV y 1 s (en lugar de 2 s) del trazo obtenido a +10mV.

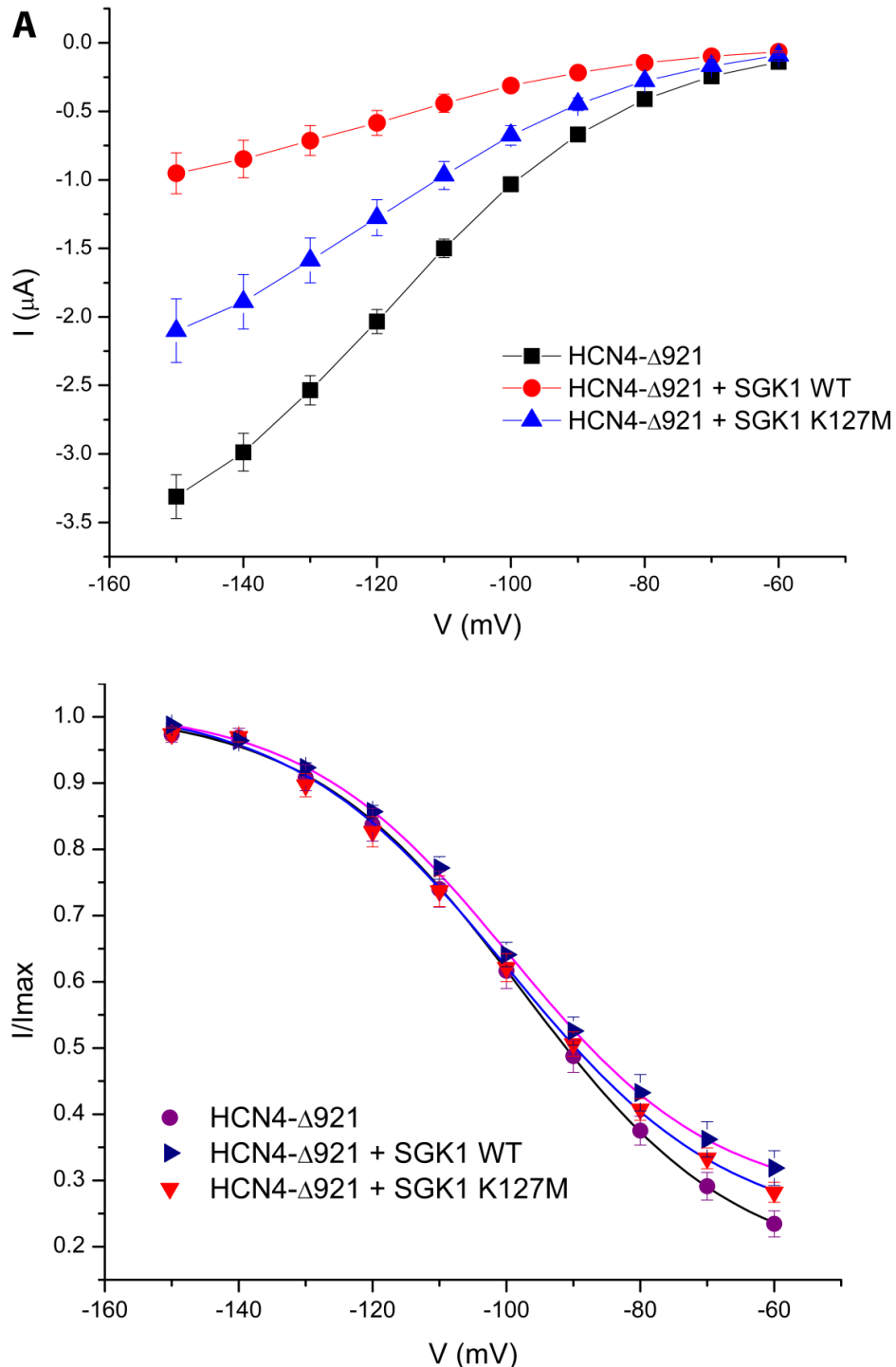


Figura 25. La cinasa inducible por suero y glucocorticoides SGK1 no afecta la dependencia del voltaje del canal HCN4-Δ921. A. Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número de ovocitos promediados que expresan al canal HCN4-Δ921 en ausencia y presencia de la cinasa SGK1 (WT y K127M). **B.** Curvas de activación del canal HCN4-Δ921 en ausencia y presencia de la SGK1. Las amplitudes de las corrientes de cola normalizadas se trazaron en función del voltaje de pre-pulso del protocolo y se ajustaron a la ecuación de Boltzmann. El $V_{1/2}$ fue -97.6 ± 2.1 mV para el canal HCN4-Δ921, -99.3 ± 2.6 mV para el HCN4-Δ921 en presencia de la SGK1 WT y -100.4 ± 1.5 mV en presencia de la SGK1 K127M; estos valores no fueron significativamente diferentes. n=15 ovocitos por grupo.

DISCUSIÓN

El mantenimiento de la homeostasis de K^+ requiere de un balance continuo entre la excreción y la ingesta por la dieta. El riñón es el órgano responsable de controlar la cantidad diaria que se excreta de este ion, lo que logra a través de la regulación del transporte de K^+ en la nefrona distal sensible a la hormona aldosterona (Boron y Boulpaep, 2009; Welling et al., 2013).

La secreción de K^+ esta acoplada a la reabsorción de Na^+ en el riñón durante dietas con alto K^+ , pero es independiente en dietas con bajo contenido de K^+ o en hipovolemia (Castañeda-Bueno et al., 2012). Uno de los principales mecanismos que permite la secreción de K^+ en la nefrona distal es la generación de un potencial negativo en el lumen por la reabsorción de Na^+ a través de los canales ENaC (Rodan et al., 2011).

Además, la entrada de Na^+ a través de ENaC en las células principales ayuda a generar el gradiente electroquímico necesario para la salida de K^+ a través de los canales de K^+ (ROMK, Maxi K y Kv1.3). Sin embargo, una fracción de la excreción de K^+ es independiente del canal ENaC (Frindt y Palmer, 2009) y, probablemente, también de los canales ROMK de las células principales (Welling et al., 2013). Cabe la posibilidad de que los responsables de esta secreción de K^+ independiente de ENaC sean los canales HCN.

Así pues, los canales de Na^+ y K^+ presentes en la ASDN son componentes clave en la regulación final de la secreción renal de K^+ ; por ello su actividad y número se regulan con precisión para asegurar que la excreción de K^+ equipare las variaciones en la cantidad de K^+ ingerida a través de la dieta (Welling et al., 2013). La aldosterona es el principal regulador de la homeostasis del K^+ ante una ingesta elevada de este ion, ya que aumenta los niveles de la cinasa SGK1.

Esta última regula positivamente la expresión y actividad de los canales de Na^+ y K^+ presentes en la ASDN (ENaC, ROMK y Kv 1.3) (Wang y Giebisch, 2009; Lang y Vallon, 2012). La expresión de los canales HCN2 y HCN4 se regula por la carga

de K^+ en la dieta (Datos no publicados), por ello podría esperarse que, al igual que otros canales presentes en la ASDN, se regulen moléculas relacionadas con el mantenimiento de la concentración plasmática de K^+ , como la cinasa SGK1, por ejemplo.

Nuestros datos confirman las observaciones previamente publicadas que demuestran que la SGK1 regula a la alta al canal Kv1.3 (Henke et al., 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la SGK1 no afecta la expresión ni la actividad del canal HCN2, aun cuando éste posee el sitio consenso de fosforilación para la cinasa. El simple hecho de que un transportador o canal iónico presente dicho sitio, no implica que ésta lo fosforile y/o que dicha modificación afecte su nivel de expresión o actividad. Tal es caso del canal Kv1.5 que posee 4 sitios consenso para la SGK1, pero esta no lo fosforila sino que lo regula a través de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 (Boehmer et al., 2008).

Cabe resaltar que además de la presencia del sitio consenso en la proteína blanco, otros factores intervienen en el reconocimiento de un auténtico sitio de fosforilación presente en el sustrato de una cinasa. Algunos de estos factores son: 1) la estructura del sitio catalítico, 2) interacciones locales y distales entre la enzima y su sustrato, 3) la formación de complejos con proteínas adaptadoras y de andamiaje que facilitan la interacción espacial entre la cinasa y el sustrato (Ubersax y Ferrell, 2007). Así pues, es probable que el sitio presente en el HCN2 no cumpla con todos los requerimientos necesarios para ser fosforilado eficientemente por la SGK1.

Además, se sabe que el sitio consenso (RXRXXS/T) de la SGK1 forma parte del motivo mínimo reconocido por otras serina-treonina cinasas como Akt (RXRXXS/T; Alessi et al., 1996) o CaMKII (RXXS/T; Songyang et al. 1996). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que el canal HCN2 sea blanco de estas u otras cinasas. CaMKII está involucrada el tráfico del canal HCN1 en el cerebro (Shin y Chetkovich, 2007). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de dicha regulación y hasta el momento no se ha reportado que CaMKII participe en el

tráfico de las demás isoformas del canal, por ello no parece muy probable que regule al HCN2 en el riñón.

Akt es una proteína cinasa clave en diversas vías de señalización, incluida la del transporte tubular renal. En el túbulo contorneado distal y el conducto colector, la fosforilación por la Akt inducida por insulina media varias señales hormonales para potenciar la actividad del cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) (Nishida et al., 2012) y del canal ENaC (Lee et al., 2007). Además, la SGK1 y la Akt regulan cooperativamente la secreción de K^+ por el canal ROMK (Cheng et al., 2011). Tomando en cuenta lo anterior parecería más probable que Akt estuviese involucrada en la regulación del canal HCN2 en la ASDN.

Como ya se mencionó, la formación de complejos con proteínas adaptadoras y de andamiaje es uno de los factores importantes para que una cinasa reconozca e interaccione con el sitio de fosforilación de algún sustrato. Un ejemplo de ello, es la regulación del canal Kv1.3 por la ubiquitin ligasa Nedd4-2, ya que este no posee el motivo PY típico de las secuencias blanco de Nedd4-2. Por ello, se sugiere que la regulación se da a través de una proteína accesoria y se propone como tal a KChAP (Henke et al., 2004), una proteína chaperona que regula a la alta a los canales Kv (Kuryshv et al., 2000) y cuya secuencia presenta el motivo PY.

Otro ejemplo, es el caso de la regulación del canal ROMK1 por la SGK1. En experimentos en ovocitos en donde se co-expresó al canal con la cinasa se observó que esta por sí sola no tiene efecto sobre su actividad. Sin embargo, cuando se co-expresa al canal ROMK1 con SGK1 y NHERF2 (una proteína que modula el tráfico de proteínas de transporte a la membrana celular), incrementa su abundancia en la membrana plasmática (Yun et al., 2002).

Nuestros resultados únicamente demuestran que la SGK1 no regula (por fosforilación directa) la actividad del canal HCN2 en el ovocito. Esto no descarta la posibilidad de que el canal este modulado por la SGK1 en el riñón o en los demás tejidos en donde se expresa como el corazón o el cerebro. Es probable que en

estos tejidos un adaptador/intermediario facilite dicha interacción y que no esté presente en un sistema de expresión heterólogo como el ovocito.

Entre las proteínas con potencial para participar como adaptadoras se encuentran: 1) NHERF2, necesario para que la SGK1 ejerza un efecto sobre los canales ROMK (Yun et al., 2002; Palmada et al.; 2003) y Kv1.5 (Laufer et al 2009); 2) TRIP8b, que es específica de cerebro, interacciona con el C-terminal de los HCN, participa en el tráfico del canal HCN1 a la membrana (Santoro et al., 2004; Lewis et al., 2009) y de la que se ha especulado sobre su posible colaboración con cinasas en la regulación de los HCN (He et al., 2014); 3) proteínas de andamiaje como tamalina y S-SCAM que interaccionan con el C-terminal del canal HCN2 y están implicadas en el tráfico de proteínas de transporte a la membrana plasmática (Kimura et al., 2004).

Por otra parte, existe la posibilidad de que el canal HCN2 este modulado por algún otro intermediario que participe en la vía de señalización de SGK1. Las cinasas WNK podrían ser una opción, ya que intervienen en la regulación del balance entre la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ renal (Subramanya et al., 2006). La familia WNK regula directa o indirectamente a los principales transportadores de Na^+ y K^+ en la nefrona distal (Hoorn et al., 2011). Por ello resultaría interesante evaluar la posibilidad de que estén involucradas en la modulación del canal HCN2.

Nuestra hipótesis fue que la SGK1 modificaría la actividad del canal HCN2 por fosforilación directa. Sin embargo, cabía la posibilidad de que la regulación se diera a través de la ubiquitin ligasa Nedd4-2, a la que SGK1 regula negativamente. Si este hubiese sido el caso, se habría observado un efecto en los experimentos realizados debido a la presencia de Nedd4-2 endógena en el ovocito. Sin embargo, no hubo cambio alguno en la corriente generada por el HCN2 cuando se coinyectó con SGK1 WT. Esto sugiere que el canal HCN2 no se ubiquitina por Nedd4-2 y, en consecuencia, no se regula por SGK1.

Otra posibilidad sería que el canal HCN2 se regule a través de la adenilato ciclasa soluble (sAC), que se considera como un nuevo mediador de la señalización de la

aldosterona en el riñón (Schmitz et al., 2014). La sAC es un quimio-sensor que media la elevación de AMPc en microdominios intracelulares (Zippin et al., 2003) en respuesta a variaciones en los niveles de bicarbonato (Chen et al., 2000); esto llama la atención tomando en cuenta que el canal HCN2 es sensible al AMPc.

Además, la sAC se propone como un importante regulador del transporte de Na⁺ en el riñón, puesto que su bloqueo interfiere con el transporte transepitelial de Na⁺ en el conducto colector. Sin embargo, se sabe que su sobre-expresión y el tratamiento con KH7 (un inhibidor específico de sAC) no modifican las corrientes producidas por ENaC en ovocitos de *Xenopus* (Hallows, et al., 2009). Estos resultados contradicen a otros, publicados recientemente, sobre el papel regulatorio de sAC en la expresión de ENaC y la ATPasa Na⁺/K⁺ (Schmitz et al., 2014).

Hasta la fecha se ha considerado al ENaC como el canal “estrella” de la ASDN en lo que a la reabsorción de Na⁺ se refiere; pero se sabe que parte de esta es independiente de dicho canal. Hasta ahora los HCN son los únicos canales de Na⁺ (además de ENaC) que se han reportado en la nefrona distal y es un hecho que participan en la reabsorción de Na⁺ y que se regulan para ayudar a mantener la homeostasis de electrolitos en el organismo (Datos no publicados).

Además de la aldosterona, la regulación del balance de Na⁺ y K⁺ también se encuentra bajo el control de las hormonas vasopresina, angiotensina II e insulina (Wang y Giebisch, 2009), a través de diferentes vías de señalización que podrían estar relacionadas con la regulación de la actividad del canal HCN2. Así pues, existen muchas otras proteínas que pudieran estar involucradas en la regulación de su tráfico y expresión. Por consiguiente, se requieren otros estudios para elucidar los intermediarios que están involucrados en la regulación del tráfico y actividad del HCN2 en el riñón.

Probar el efecto de cada una de las posibles moléculas involucradas en su regulación co-expresándolas en ovocitos sería una labor titánica que llevaría mucho tiempo. Lo ideal sería caracterizar el interactoma del canal HCN2 en el

riñón para poder esclarecer la regulación de su actividad y tráfico en este tejido. Entre los métodos experimentales más usados para determinar las interacciones proteína-proteína se encuentran: 1) ensayos de doble híbrido en levaduras; 2) purificación por afinidad en tándem y 3) el uso de chips de proteínas. Cualquiera de estas técnicas nos mostraría un panorama general de las interacciones del canal HCN2, lo que serviría como base para profundizar en los mecanismos involucrados en relación con alguna proteína de interés.

Con respecto al canal HCN4, nuestros resultados revelan que el canal truncado en el carboxilo terminal HCN4- Δ 921 (correspondiente al tamaño del canal HCN4 cortado, observado en riñón) es funcional; esto respalda el hecho de que la forma proteolizada de ~95 KDa observada en riñón funciona como una vía de entrada de Na^+ y K^+ a las células. Se esperaba que el canal HCN4- Δ 921 fuera funcional, pero no que su actividad fuera mayor comparada con el canal completo.

Cabe resaltar que el $V_{1/2}$ de activación no se modificó, lo que es lógico considerando que el canal HCN4- Δ 921 únicamente carece de los últimos 282 aminoácidos, por lo que aún conserva gran parte del carboxilo terminal, incluyendo el dominio de unión a nucleótidos cíclicos. Las mutaciones y deleciones que afectan al CNBD suelen desplazar el $V_{1/2}$ de activación de los HCN a valores más positivos, similares a los que se obtienen por la unión del AMPc (Magee, Madden y Young, 2015).

Por lo que respecta al incremento de la actividad observada con el canal HCN4- Δ 921, pudiera deberse a que se sintetiza más rápido y por ende alcanza niveles mayores en un menor tiempo o bien a que su traslocación a la membrana plasmática se ve favorecida. Se requiere realizar otros ensayos, como inmunodetección o marcaje con anticuerpos fluorescentes para establecer la causa.

Los canales HCN2 y HCN4 se co-ensamblan (heteromultímeros) y auto-ensamblan (homomultímeros) con igual preferencia en células CHO (Whitaker et al., 2007). En el corazón el canal HCN2 se encuentra proteolizado en su forma “madura” y forma heteromultímeros funcionales con el canal HCN4 (Ye y

Nerbonne, 2009). Cabe mencionar, que la proteólisis de los HCN así como la formación de heteromultímeros se ha asociado a la variedad de propiedades de la corriente Ih nativa en diferentes tejidos (Calejo et al., 2014; Ye y Nerbonne, 2009).

Resulta interesante que la cinasa SGK1 no altera la actividad del canal HCN4 WT, mientras que disminuye significativamente la actividad observada para el canal HCN4- Δ 921. El efecto también se observa en presencia de la mutante inactiva de la cinasa SGK1, por lo que podría pensarse que es independiente de la fosforilación. Esto se ha observado previamente en otros canales, un ejemplo es la cinasa L-WNK1 que incrementa la abundancia y expresión funcional del canal BK de manera independiente de su sitio catalítico (Webb et al., 2016).

Sin embargo, aun cuando la mutante inactiva también afecta la corriente observada para el HCN2 no lo hace en la misma magnitud que la SGK1 WT. Por lo tanto, es posible que parte de esa disminución “extra” (Figura 24 B) se deba a la fosforilación por la SGK1, ya sea directa o de algún intermediario. Cabe recordar que, en la mayoría de los casos, las cinasas que regulan negativamente la actividad de los canales no abaten completamente la actividad de su blancos. Un ejemplo de ello es la activación de la PKC que disminuye sólo en un ~40% la corriente producida por los HCN (Liu et al., 2003).

El $V_{1/2}$ de activación no se modifica por efecto de la cinasa, por lo que parece probable que lo que se afecte sea su síntesis o su traslocación a la membrana. Entre los principales mecanismos que afectan una gran variedad de procesos biológicos se encuentran las interacciones proteína-proteína (IPP); los contactos no covalentes entre los aminoácidos de cadenas laterales son la base para el plegamiento de proteínas, ensamblaje y las IPP (Ofrañ Y Rost, 2003).

Dado que la cinasa SGK1, disminuye la actividad del canal HCN4 truncado (HCN4- Δ 921), mientras que no afecta al canal completo, parece probable que se deba a un mecanismo de interacción proteína-proteína entre la cinasa y el canal. También podría suceder que el amino y el carboxilo del canal se encuentren interaccionando en el citoplasma formando algún tipo de estructura terciaria. De

modo que, la delección de una parte del C-terminal deje expuesta la parte del amino en la que se encuentra el sitio de fosforilación para SGK1, lo que “facilitaría” la fosforilación.

Para el caso de las IPP las hipótesis probables son: 1) la interacción ocurre en un sitio del canal que está menos accesible en el canal completo. La delección de los últimos 282 aminoácidos del canal de alguna manera podría dejar expuesto dicho sitio, de manera que la SGK1 pudiera interaccionar con él y de este modo interferir, ya sea con su plegamiento o con su ensamblaje; 2) la SGK1 interfiere con la interacción entre el canal HCN4 y alguna proteína de andamiaje necesaria para su expresión en la membrana.

Cabe recordar que la regulación de los HCN por interacción con proteínas ya se ha establecido previamente, por ejemplo, el caso de TRIP8b que regula el tráfico a la membrana del canal HCN1 a través de su interacción con el carboxilo terminal (Santoro et al., 2004; Santoro et al, 2011). Otro ejemplo es la filamina A, que afecta la localización del canal HCN1 en la membrana a través de su interacción con el carboxilo terminal (Gravante et al, 2004). Por otra parte, el canal HCN2 interacciona con otras proteínas de andamiaje como tamalina, S-SCAM y Mint2 a través del C-terminal. Además, se sugiere que podrían desempeñar un papel importante en el tráfico o distribución del canal (Kimura et al., 2004).

Es un hecho que la regulación de los HCN por la interacción con proteínas se relaciona con su expresión en la membrana plasmática, debido a ello, si la regulación del canal HCN4- Δ 921 por SGK1 ocurre en el riñón (independientemente del mecanismo) constituiría un método de regulación eficaz en situaciones en las que se requiera inhibir su función a corto plazo.

CONCLUSIONES

La cinasa SGK1 no regula la actividad del canal HCN2 y HCN4 WT en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El canal HCN4- Δ 921 es funcional y sus propiedades biofísicas son similares a las del canal completo.

La cinasa SGK1 regula a la baja la actividad del canal HCN4- Δ 921.

PERSPECTIVAS

Etiquetar al canal HCN2 para realizar ensayos de purificación por afinidad en tándem y utilizar métodos de espectrometría de masas para identificar a las proteínas con las que interacciona.

Realizar ensayos de inmunodetección en ovocito con los canales HCN4 y HCN4 Δ -921 para evidenciar si la abundancia de este último es mayor con respecto al canal WT.

Etiquetar al canal HCN4 y HCN4 Δ -921 para determinar por microscopía confocal si los niveles de proteína o su distribución celular son distintos; del mismo modo evaluar si la SGK1 disminuye la presencia del canal HCN4- Δ 921 en la membrana plasmática de ovocitos.

REFERENCIAS

Aidley, J.D., Stanfield, P.R. "Ion Channels: Molecules in Action". 1st Ed, Cambridge University Press, UK, 1998, pp 1-15.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., "Molecular Biology of the Cell". 4th edition, Garland Science, New York, 2002 pp 583-631.

Alessi DR, Barry Caudwell F, Andjelkovic M, Hemmings BA & Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. FEBS letters, 1996; 399(3): 333-338.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M & DiFrancesco D. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. J. Physiol., 2003; 549: 347–359.

Baltaev R, Strutz-Seebohm N, Korniyuchuk G, Myssina S, Lang F, & Seebohm G. Regulation of cardiac shal-related potassium channel Kv 4.3 by serum-and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in *Xenopus* oocytes. Pflügers Archiv., 2005: 450(1); 26-33.

Bianchi L & Driscoll M. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. WormBook, 2006; 1: 1-16.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S & Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. Physiol Rev., 2009; 89:847–885.

Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F & Palmada M. Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1. 5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. Cellular Physiology and Biochemistry, 2008: 22(5-6); 591-600.

Bolivar JJ, Tapia D, Arenas G, Castañón-Arreola M, Torres H, & Galarraga E. A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (Ih-like) cationic current and HCN genes expression in renal inner medullary collecting duct cells. Am J Physiol Cell Physiol., 2008; 294: C893–C906.

Boron, W. F., Boulpaep, E. L. "Medical Physiology a Cellular and Molecular approach". 2nd ed., Saunders, USA, 2009, pp 749-880.

Bruno S, Chiabotto G & Camussi G. Concise Review: Different mesenchymal stromal/stem cell populations reside in the adult kidney. Stem cells translational medicine, 2014; 3(12), 1451-1455.

Cai H, Cebotaru V, Wang YH, Zhang XM, Cebotaru L, Guggino SE, & Guggino WB. WNK4 kinase regulates surface expression of the human sodium chloride cotransporter in mammalian cells. Kidney international, 2006; 69(12): 2162-2170.

Calejo AI, Reverendo M, Silva VS, Pereira PM, Santos MA, Zorec R & Gonçalves PP. Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol Biol Rep.*, 2014; 41(1): 297-307.

Carrisoza-Gaytán R, Rangel C, Salvador C, Saldaña-Meyer R, Escalona C, Satlin LM, Liu W, Zvilowitz B, Trujillo J, Bobadilla NA, & Escobar LI. The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron. *Kidney Int* 2011; 80:832-840.

Castaneda-Bueno M, Arroyo JP, & Gamba G. Independent regulation of Na⁺ and K⁺ balance by the kidney. *Medical Principles and Practice*, 2012; 21(2): 101-114.

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, & McNaughton PA. Ion channels gated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999; 96(14): 7658-7663.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, & Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 2000; 289(5479): 625-628.

Chen S, Wang J & Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.*, 2001; 117: 491–504.

Cheng CJ & Huang CL. Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011; 22(3): 460–471.

Conti, F. "Fisiología Médica". McGraw-Hill Interamericana, México, 2010, pp 62-81.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. "The cell: A Molecular Approach. 2nd ed., Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

Diakov A & Korbmacher. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum-and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's α -subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279(37): 38134-38142.

Drucker Colín R. "Fisiología Médica". El Manual Moderno, México, 2005, pp 193-272.

DuBose TD Jr & Good DW. Effects of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats. *Am J Physiol.*, 1991; 260: 680-687.

Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals *J. Morphol.*, 1972; 136: 153-157.

El-Kholy W, MacDonald PE, Lin JH, Wang J, Fox JM, Light PE, Wang Q, Tsushima RG, & Wheeler MB. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol.*, 2007; 21: 753–764.

Friedman SM. Evidence for an enhanced transmembrane sodium (Na⁺) gradient induced by aldosterone in the incubated rat tail artery. *Hypertension*, 1982; 4(2): 230-237.

Frindt G & Palmer LG. K^+ secretion in the rat kidney: Na^+ channel-dependent and independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297: F389-96.

Goilav B & Trachtman H. Disorders of potassium balance. In *Fluid and Electrolytes in Pediatrics*. Humana Press, 2010: 67-102.

Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi I, Viscomi C & DiFrancesco D. Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J Biol Chem*., 2004; 279: 43847–43853.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR & Mairbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 1971; 233:177-182.

Guyton, A. C., Hall, J. E. "Tratado de fisiología Medica". 12ª Ed. Elsevier, España, 2011, pp 303-393.

Hallows KR, Wang H, Edinger RS, Butterworth MB, Oyster NM, Li H, Buck J, Levin LR, Johnson JP, & Pastor-Soler NM. Regulation of epithelial Na^+ transport by soluble adenylyl cyclase in kidney collecting duct cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2009; 284(9): 5774-5783.

Hammelmann V, Zong X, Hofmann F, Michalakakis S & Biel M. The cGMPdependent protein kinase II is an inhibitory modulator of the hyperpolarization activated HCN2 channel. *PLoS One*. 2011; 6: e17078.

He C, Chen F, Li B & Hu Z. Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*. 2014; 112: 1–23.

Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, & Lang F. Regulation of the voltage gated K channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J. Cell. Physiol*. 2004; 199, 194–199.

Hille, B. "Ion channels of excitable membranes". 2001. Sunderland, Mass.

Hoorn EJ, Nelson JH, McCormick JA, & Ellison DH. The WNK kinase network regulating sodium, potassium, and blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011; 22(4): 605-614.

Jessulat M, Pitre S, Gui Y, Hooshyar M, Omid K, Samanfar B, Tan LH, Alamgir M, Green J, Dehne F, & Golshani A. Recent advances in protein–protein interaction prediction: experimental and computational methods. *Expert opinion on drug discovery*, 2011; 6(9): 921-935.

Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, & Lifton RP. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K^+ secretion. *Nature genetics*, 2003; 35(4): 372-376.

Kaupp UB, & Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annual review of physiology*, 2001; 63: 1, 235-257.

Kimura K, Kitano J, Nakajima Y & Nakanishi S. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal

scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction. *Genes Cells*, 2004; 9: 631–64.

Kobayashi T & Cohen P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J.*, 1999; 339 (Pt 2):319-328.

Koeppen, B.M., Stanton, B.A. "Berne & Levy. *Fisiología Humana*". 6ª edición. Ed. Elsevier, Barcelona, 2009 pp 557-649.

Kouranova EV, Strassle BW, Ring RH, Bowlby MR & Vasilyev DV. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience*, 2008; 153: 1008–1019.

Kuryshev YA, Gudz TI, Brown AM & Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K(p) channels. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2000; 278: C931–C941.

Kusch J, Biskup C, Thon S, Schulz E, Nache V, Zimmer T, Schwede F & Benndorf K. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron*, 2010; 67: 75–85.

Lang F, Artunc F, & Vallon V. The physiological impact of the serum-and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2009; 18(5): 439.

Lang F, & Vallon V. Serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the regulation of renal and extrarenal potassium transport. *Clinical and experimental nephrology*, 2012; 16(1); 73-80.

Lang F & Shumilina E. Regulation of ion channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB J.*, 2013; 27: 3–12.

Lang F & Stournaras C. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)*, 2013; 12(2):160-171.

Lang F, Stournaras C & Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular Membrane Biology*, 2014; 31:1, 29-36.

Laufer J, Boehmer C, Jeyaraj S, Knuwer M, Klaus F, Lindner R, Palmada M, & Lang F. The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na/H exchanger regulatory factor 2. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2009; 23: 25–36.

Lee IH, Dinudom A, Sanchez-Perez A, Kumar S, & Cook DI. Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(41); 29866-29873.

Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL & Chetkovich DM. Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J Neurosci.*, 2009; 29: 6250–6265.

Li CH, Zhang Q, Teng B, Mustafa SJ, Huang JY & Yu HG. Src tyrosine kinase alters gating of hyperpolarization-activated HCN4 pacemaker channel through Tyr531. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2008; 294: C355–C362.

Liao Z, Lockhead D, Larson ED & Proenza C. Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *The Journal of general physiology*, 2010; jgp: 201010488.

Liu Z, Bunney EB, Appel SB, & Brodie MS. Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *Journal of neurophysiology*, 2003; 90(5): 3201-3212.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F & Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.*, 1999; 18:2323-2329.

Macri V, Angoli D & Accili EA. Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Sci. Rep.*, 2012; 2: 894.

Maeshima A, Yamashita S & Nojima Y. Identification of renal progenitor like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.*, 2003; 14(12): 3138-46.

Magee KE, Madden Z, & Young EC. HCN channel C-terminal region speeds activation rates independently of autoinhibition. *The Journal of Membrane Biology*, 2015; 248(6): 1043-1060.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, & Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell*, 2002; 10(1): 151-162.

Manning BD, & Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007; 129(7): 1261-1274.

Miledi R, Parker I & Sumikawa K. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 1982; 1:1307–1312.

Miledi R, Parker I & Sumikawa K. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1982; 216:509–515.

Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A & Biel M. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 43781–43786.

Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E & Kaupp UB. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci.*, 2003; 17: 2084–2096.

Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, & Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/ SPAK-NCC

phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension*, 2012; 60(4): 981–990.

Ofran Y & Rost B. Analysing six types of protein–protein interfaces. *Journal of molecular biology*, 2003; 325(2): 377–387.

Palmada M, Embark HM, Yun C, Bohmer C & Lang F. Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K channel ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003: 311; 629–634.

Palmada M, Embark HM, Wyatt AW, Bohmer C & Lang F. Negative charge at the consensus sequence for the serum- and glucocorticoid-inducible kinase, SGK1, determines pH sensitivity of the renal outer medullary K channel, ROMK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003: 307, 967–972.

Parker AR, Welch MA, Forster LA, Tasneem SM, Dubhashi JA & Baro DJ. SUMOylation of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 (HCN2) increases surface expression and the maximal conductance of the hyperpolarization-activated current. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2016; 9: 168.

Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, & Kohan DE. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014; CJN-05760513.

Poolos NP, Bullis JB & Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 7995–8003.

Postea O, & Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011; 10(12): 903–914.

Rodan AR, Cheng CJ & Huang CL. Recent advances in distal tubular potassium handling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2011; 300(4): F821–F827.

Roy A, Al-bataineh MM, & Pastor-Soler NM. Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2015; 10(2): 305–324.

Santoro B, Chen S, Lüthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, & Siegelbaum SA. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20:14; 5264–5275.

Santoro B, Wainger BJ & Siegelbaum SA. Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci.*, 2004; 24: 10750–10762.

Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, Hu L, Liu H & Siegelbaum SA. TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron.*, 2009; 62: 802–813.

Santoro B, Hu L, Liu H, Saponaro A, Pian P, Piskorowski RA, Moroni A, & Siegelbaum SA. TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal interaction sites. *J Neurosci.*, 2011; 31: 4074–4086.

Schmitz B, Brand SM & Brand E. Aldosterone signaling and soluble adenylyl cyclase—A nexus for the kidney and vascular endothelium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2014; 1842(12): 2601-2609.

Schmitz B, Nedele J, Guske K, Maase M, Lenders M, Schelleckes M, Kusche-Vihrog K, Brand SM & Brand E. Soluble adenylyl cyclase in vascular endothelium: gene expression control of epithelial sodium channel- α , Na⁺/K⁺-ATPase- α/β , and mineralocorticoid receptor. *Hypertension*, 2014; 63 (4): 753–761

Shin M & Chetkovich DM. Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 33168–33180.

Snyder PM, Olson DR & Thomas BC. Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(1): 5-8.

Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, & Cantley LC. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin dependent kinase, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 6486–6493.

Stühmer W. & Parekh AB. Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In *Single-channel recording*. Springer US., 1995; 341-356

Subramanya AR, Yang CL, McCormick JA & Ellison DH: WNK kinases regulate sodium chloride and potassium transport by the aldosterone-sensitive distal nephron. *Kidney Int.*, 2006; 70: 630–634.

Tannen RL. Relationship of renal ammonia production and potassium homeostasis. *Kidney Int.*, 1977; 11: 453–465.

Ubersax JA & Ferrell Jr JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007; 8(7): 530-541.

Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F & Biel M. Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett.*, 2000; 479: 35–40.

Vallon V, Wulff P, Huang DY, Loffing J, Volkl H, Kuhl D & Lang F. Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2005; 288: R4–10.

Wagner CA, Friedrich BOR, Setiawan I, Lang F & Bröer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2000; 10(1-2): 1-12.

Wahl-Schott C & Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66:470–494.

Waldegger S, Barth P, Raber G, & Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and

isotonic alterations of cell volume. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997; 94(9), 4440-4445.

Wang W. Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu. Rev. Physiol.*, 2004; 66: 547-569.

Wang WH & Giebisch G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.*, 2009; 458:157–168.

Wärntges S, Friedrich B, Henke G, Duranton C, Lang PA, Waldegger S, Meyermann R, Kuhl D, Speckmann EJ, Obermüller N, Witzgall R, Mack AF, Wagner HJ, Wagner A, Broer S & Lang F. Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch.*, 2002; 443: 617–624.

Webb TN, Carrisoza-Gaytan R, Montalbetti N, Rued A, Roy A, Socovich AM, Subramanya AR, Satlin LM, Kleyman TR & Carattino MD. Cell-specific regulation of L-WNK1 by dietary K. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2016; 310(1).

Webster MK, Goya L, Ge YI, Maiyar AC & Firestone GL. Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and Cellular Biology*, 1993; 13(4): 2031-2040.

Weiner ID, & Wingo CS. Hyperkalemia: a potential silent killer. *Journal-american society of nephrology*, 1998; 9: 1535-1543.

Welling PA. Regulation of renal potassium secretion: molecular mechanisms. In *Seminars in nephrology*. 2013; 33 (3): 215-228.

Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto & Accili EA. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(31): 22900-22909.

Williams AD, Jung S & Poolos NP. Protein kinase C bidirectionally modulates Ih and HCN1 channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 2015; 593(13):2779-92

Xie J, Craig L, Cobb MH, & Huang CL. Role of with-no-lysine [K] kinases in the pathogenesis of Gordon's syndrome. *Pediatric Nephrology*, 2006; 21(9): 1231-1236.

Yang CL, Angell J, Mitchell R, & Ellison DH. WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *The Journal of clinical investigation*, 2003; 111(7): 1039-1045.

Yang CL, Zhu X, Wang Z, Subramanya AR, & Ellison DH. Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *The Journal of clinical investigation*, 2005; 115(5): 1379-1387.

Yang CL, Zhu X & Ellison DH. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest.*, 2007; 117: 3403–3411.

- Yang SS, Hsu YJ, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S & Lin SH. Mechanisms for hypercalciuria in pseudohypoaldosteronism type II-causing WNK4 knock-in mice. *Endocrinology*, 2010; 151(4): 1829-1836.
- Ye B & Nerbonne JM. Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry*, 2009; 284(38): 25553-25559.
- Yeh J, Kim BS, Gaines L, Peresie J, Page C, & Arroyo A. The expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels in the rat ovary are dependent on the type of cell and the reproductive age of the animal: a laboratory investigation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2008; 6(1): 35.
- Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D & Welling PA. Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 23066–23075
- Yu HG, Lu Z, Pan Z & Cohen IS. Tyrosine kinase inhibition differentially regulates heterologously expressed HCN channels. *Pflugers Arch.*, 2004; 447: 392–400.
- Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmacher C, Cohen P, Pearce D, & Lang F. The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002; 13(12): 2823-2830.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R & Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 2003; 425: 200–205.
- Zha Q, Brewster AL, Richichi C, Bender RA & Baram TZ. Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *Journal of neurochemistry*. 2008; 105(1): 68-77.
- Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D & Kone BC. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel α . *Journal of Clinical Investigation*, 2007; 117(3): 773.
- Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levin LR & Buck J. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *The FASEB Journal*, 2003; 17(1): 82-84.
- Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H, Fang L, Li R, Mistrik P, Gerstner A, Much B, Baumann L, Michalakis S, Zeng R, Chen Z & Biel M. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 34224–34232.

ANEXO

Preparación de células competentes con el método de cloruro de rubidio

Preparación de soluciones:

- Solución A
 - 10 mM MOPS; pH 7.0
 - 10 mM Cloruro de Rubidio (RbCl)
- Solución B
 - 100 mM MOPS; pH 6.5
 - 50 mM Cloruro de Calcio (CaCl_2)
 - 10 mM Cloruro de Rubidio (RbCl)

Preparación de células competentes

- 1) Filtrar las soluciones A y B antes de utilizarlas
- 2) Inocular 5 mL de medio LB con una colonia bacteriana (DH α -5, etc.) ó con 10 μL del stock original. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación constante.
- 3) Inocular 20 mL de medio LB con 200 μL del cultivo bacteriano del paso 2 e incubar a 37 °C con agitación constante.
- 4) Crecer las células hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.3-0.5 a 600 nm (aproximadamente 3 horas).
- 5) Centrifugar las células 5 minutos a 4000 rpm y 4 °C en un tubo estéril.
- 6) Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de Solución A fría. Llevar las células a un volumen final de 10 mL con la solución A. Centrifugar las células por 5 minutos a 4000 rpm a 4 °C.
- 7) Decantar el sobrenadante. Re-suspender las células en 1 mL de Solución B fría. Llevar las células a un volumen final de 10 mL con solución B.
- 8) Incubar en hielo por 30 minutos. Centrifugar las células como en el paso 6.
- 9) Decantar el sobrenadante y secar el tubo. Resuspender las células en 2 mL de Solución B.
- 10) Hacer alícuotas de las células de 200 μL y agregar 20 μL de glicerol (estéril). Congelar las células en hielo seco y guardar a -70 °C (estables de 5-6 semanas).

Protocolo de transformación

- 1) Mezclar 200 μL de células competentes con 0.05-0.05 μg de DNA plasmídico en un tubo Eppendorf.
- 2) Incubar en hielo por 30 minutos.
- 3) Dar un choque térmico a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos. Enfriar las células por unos segundos sobre hielo.
- 4) Agregar 1mL de LB (sin antibiótico). Incubar 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1h.
- 5) Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 6) Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 200 μL de medio LB.
- 7) Agregar estos 200 μL de células a una caja de cultivo bacteriano (LB/Ampicilina; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 8) Incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ 12-14 horas.
- 9) Revisar el número de colonias.

Gel para RNA

Preparación de gel de RNA

- 1) Pesar 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer. Agregar 25 mL de agua desionizada y registrar masa del matraz.
- 2) Calentar hasta la disolución de la agarosa y reconstituir volumen con agua hasta la masa inicial, para compensar la pérdida por evaporación.
- 3) Agregar 3 mL de MOPS 10x.
- 4) Agregar 1.5 mL de formaldehído al 37%. Mezclar bien y agregarlo a la unidad de gel.
- 5) Dejar solidificar.

Preparación de muestras para gel

- 1) Preparar una mezcla de reacción de acuerdo al número de muestras de RNA a correr en el gel. Se requiere 1 μL de RNA por muestra.

Reactivo	Volumen para una reacción (μL)
Formamida	5
MOPS 10x	1
Formaldehído	2
Buffer de carga	1
Bromuro de etidio (10mg/mL)	0.15

- 2) Colocar en un tubo Eppendorf 1 μ L de RNA más 8.1 μ L de la mezcla de reacción.
- 3) Calentar las muestras por 10 minutos a 65 °C.
- 4) Cargar el gel y correr la electroforesis a 75 mV.

Solución de tricaína 0.2%

1. Pesar 1g de Tricaína.
2. Colocar en un volumen de 300 mL y disolver.
3. Ajustar el pH a un valor de 7.4.
4. Llevar a un volumen final de 500 mL.