



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROTEÓMICA DEL CANAL DE POTASIO GIRK4

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

ESTEFANIA LEONOR ROSAS CORTINA



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres**
VOCAL: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**
SECRETARIO: **Profesor: Leonila Irma Laura Escobar Pérez**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Edgar Axel Donjuan Guerrero**
2º SUPLENTE: **Profesor: Jacob Alejandro Hernández Tapia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

M. EN C. CAROLINA SALVADOR HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:

ESTEFANIA LEONOR ROSAS CORTINA

El financiamiento de este estudio fue concedido por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM a través de la DGAPA. Las claves de los proyectos son IN214316 y IN224919.

Índice	1
3. Índice de figuras	7
4. Índice de tablas	9
5. Resumen	10
6. Antecedentes	11
6.1 Canales iónicos	11
6.1.1 Canales de potasio (K ⁺)	12
6.1.2 Los canales Kir	14
6.1.3 Estructura de los canales Kir	15
6.1.4 Clasificación de los Kir	15
6.2 Receptores acoplados a las proteínas G	16
6.3 Proteínas G	17
6.4 Subfamilia Kir3 o GIRK	18
6.5 GIRK4 (Kir3.4)	19
6.5.1 Enfermedades relacionadas con la expresión del canal GIRK4	20
6.6 Proteómica	21
6.7 Programas bioinformáticos	22
7. Justificación	24
8. Objetivos	25
8.1 Objetivo general	25
8.2 Objetivos particulares	25
9. Hipótesis	26
10. Procedimiento experimental	27
10.1 Subclonación del gen del canal GIRK4	27
10.1.1 Biología Molecular	27
10.1.2 Reacción de la PCR	27
10.1.3 Reacción de ligación	31
10.1.4 Minipreparación QIAGEN para obtención del DNA	32
10.1.5 Secuenciación	33
10.1.6 Midipreparación para obtención del DNA	33
10.2 Transfección a células humanas de riñón HEK293T	33
10.3 Cuantificación de proteínas	34

10.4 Inmunoprecipitación	34
10.4.1 Preaclarado de perlas.....	34
10.4.2 Electroforesis y Western Blot	35
10.4.4 Tinción con azul de coomassie	36
10.5 Preparación de la muestra para proteómica.....	36
10.6 Proteómica.....	37
11. Resultados y discusión.....	39
11.1 Determinación de la posición y dirección del canal GIRK4 en el vector pBluescript SK-.....	39
11.2 Reacción de la ligación.....	42
11.3 Secuenciación.....	45
11.4 Fluorescencia de las células HEK293T transfectadas con el DNA de GFP y con GFP-GIRK4.....	47
11.5 Comparación de la especificidad de los anticuerpos JL-8 monoclonal y del GIRK4 policlonal.....	48
11.6 Inmunoprecipitación con el anticuerpo JL-8 y las perlas con proteína G.....	50
11.7 Análisis proteómico	51
11.8 Proteínas reportadas que interaccionan con el canal GIRK4.....	57
11.9 Descripción de las proteínas de posible interés.....	58
11.10 Discusión general.....	61
12. Conclusiones	63
13. Perspectivas	64
14. Bibliografía	65
15. Anexo de protocolos	73

2. Abreviaturas

°C	grados Celcius
aa	aminoácidos
DNA	Ácido desoxirribunucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
BM	Biología molecular
BSA	albúmina sérica de bovino
cm	centímetros
CT	control
DMSO	dimetilsulfóxido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
EGFP	Proteína Verde fluorescente
g	gramos Canal de potasio rectificador entrante activado por la proteína G
GIRK	G
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano
IAA	iodoacetamida
IP	inmunoprecipitado
kDa	kilodaltones
LaNSE	Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales
LB	Luria Broth
µL	microlitros
mL	mililitros
mM	milimolar
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
mV	milivolts
nm	nanometros
pb	pares de bases
PBS	buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pEGFP-C1	vector de expresión con la secuencia de EGFP
PEI	polietilenimina
rpm	revoluciones por minuto
rcf	fuerza centrífuga relativa o fuerza g
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sn	sobrenadante
SSI	solución salina isotónica
TA	temperatura ambiente

3. Índice de figuras

Figura 1. Las 4 principales familias de canales de potasio. Los cilindros representan los segmentos TM y la región formadora de poro se representa como un bucle por encima. a) Familia con 6TM/1P que incluye a los canales dependientes de calcio y los que se abren por voltaje. En el segmento TM 4 tiene signos positivos que hacen referencia a la sensibilidad que tiene al voltaje. b) Familia con 2TM/1P que incluye a los kirs. c) Familia con 4TM/1P a la cual pertenecen canales de unión o de fondo porque conducen iones dependiendo de la concentración extracelular de potasio y son independientes de voltaje. d) Familia con 8TM/2P, sólo se ha encontrado un canal en levaduras. Modificada de Bigging et al., 2000.	13
Figura 2. Estructura del filtro de selectividad del GIRK2. Tomada de Glaaser & Slesinger, 2015.....	15
Figura 3. Vía de señalización de las proteínas Gai/Ga0. Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005.....	17
Figura 4. Esquema de la amplificación de la secuencia de DNA utilizando la PCR. Se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron. Ya que se amplificó la banda deseada, se purificó para poder llevar a cabo la ligación con el plásmido pEGFP-C1.	29
Figura 5. Esquema general de la subclonación del canal GIRK4.	32
Figura 6. Mapa de la secuencia del canal GIRK4 subclonado en el vector pBluescript SK. Se muestran algunos sitios para enzimas de restricción. La parte gris es la secuencia del GIRK4 y la flecha inferior roja es la secuencia que codifica para la proteína de interés. Se observa que la secuencia del canal está insertada entre XbaI y XhoI. Mapa hecho en GenScript®.....	39
Figura 7. Separación por electroforesis en el que se muestran las digestiones enzimáticas del DNA pBluescript SK-/GIRK4 con XbaI y XhoI (carril 2) y digerido con XbaI y BamHI (carril 3). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.	40
Figura 8. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran las digestiones enzimáticas del DNA pBluescript SK-/GIRK4 íntegro (carril 2), digerido con XhoI, XbaI y Scal (carril 3), digerido con BamHI y XhoI (carril 4) y digerido con XhoI (carril 5). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.	40
Figura 9. Separación por electroforesis de los fragmentos digeridos del vector pEGFP-C1 (carril 2 y 3) y del fragmento amplificado por PCR (carril 4 y 5). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.	42
Figura 10. Mapa de la secuencia del canal GIRK4 en el vector pEGFP-C1. Se muestran algunos sitios de enzimas de restricción. Mapa hecho en GenScript®.....	43
Figura 11. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran las digestiones enzimáticas del plásmido pEGFP-C1/GIRK4 con XbaI y Sall (carril 2) y digerido con EcoRI (carril 3). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.....	44
Figura 12. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran los resultados de las digestiones enzimáticas del plásmido pEGFP-C1/GIRK4 con XbaI (carril 2), digerido con Sall (carril 3) y con HindIII (carril 4). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.	44

Figura 13. Electroferograma representativo de la secuencia del canal GIRK4.....	46
Figura 14. Alineamiento de los resultados de la secuenciación con el reportado en Krapivinsky et al. 1995 para GIRK4. GIRK4 es la secuencia que se mandó al IBT y GIRK4pubmed es la reportada en Genbank (L35771). Se muestra la secuencia de Sall (cuadrado morado) y la última parte de la secuencia que codifica para la proteína GFP (subrayado en verde).....	46
Figura 15. A la izquierda-Células HEK293T transfectadas con el DNA pEGFP C-1. A la derecha-Células HEK293T transfectadas con el DNA pEGFP C-1/GIRK4. Amplificación de 40x.	47
Figura 16. Inmunoblot con el anticuerpo policlonal para GIRK4 del lisado de las células HEK293T sin transfectar como control (carril 1), el lisado de las células HEK293T transfectadas con el vector pEGFP-C1 (carril 2) y el lisado de las células HEK293T transfectadas con el plásmido pEGFP-C1/GIRK4.	48
Figura 17. Inmunoblot con el anticuerpo monoclonal para EGFP del lisado de las células HEK293T sin transfectar como control (carril 1), el lisado de las células HEK293T transfectadas con el vector pEGFP-C1 (carril 2) y el lisado de las células HEK293T transfectadas con el plásmido pEGFP-C1/GIRK4 (carril 3).	49
Figura 18. Separación por electroforesis en un gel de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Se corrieron los inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal para EGFP de la muestra control negativo sobrenadante del inmoprecipitado (carril 2) y su inmunoprecipitado (carril 3), y la proteína EGFP-GIRK4 sobrenadante (carril 4) y su inmunoprecipitado (carril 5). El marcador se observa en el carril 1 como referencia de los pesos.	50
Figura 19. Diagrama de Venn de los filtros empleados en el análisis de los resultados obtenidos del ensayo proteómico.	51
Figura 20. Red de interacciones del conjunto de proteínas relevantes. Los colores de las proteínas son los que el programa otorgó según la cantidad de interacciones que tienen con otras. Aquellas donde se observa una estructura en su interior, significa que ya se conoce o se predice cómo es su estructura tridimensional. Las líneas que vinculan a las proteínas son: verde – se mencionan ambas proteínas en un mismo texto, azul- en bases de datos actualizadas, rosa- determinados con soporte experimental y gris- se tratan de proteínas homólogas entre ellas mismas. KCNJ5 (la esfera señalada en el cuadro rojo) es el gen que codifica para el canal GIRK4.	53
Figura 21. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento de acuerdo a sus funciones moleculares del conjunto de proteínas relevantes, Se agrupan en las categorías: unión (■), actividad catalítica (■), actividad molecular traductora (■), actividad estructural molecular (■) y actividad transportadora (■).	54
Figura 22. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por sus procesos biológicos del conjunto de proteínas relevantes. Se agrupan en las categorías: regulación biológica (■), biogénesis (■), proceso celular (■), localización (■), proceso metabólico (■), proceso multicelular del organismo (■) y respuesta al estímulo (■).	55
Figura 23. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por clase de proteínas del conjunto de proteínas relevantes. Se agruparon en las siguientes categorías: chaperona (■), proteína del citoesqueleto (■), modulador enzimático (■), hidrolasa (■), de unión de ácidos nucleicos (■) y receptora (■).	55

Figura 24. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por vías de señalización del conjunto de proteínas relevantes y se agrupan en las siguientes categorías: vía de señalización de apoptosis (■), regulación del citoesqueleto por medio de Rho GTPasa (■), señalización del receptor II GABA (■), vía de señalización de la hormona liberadora de gonadotropina (■), vía de señalización de la proteína G-vía de Gi/Gs (■), vía de señalización de la proteína G-vía de Gi/Go (■), enfermedad de Huntington (■), vía de señalización del receptor 2 y 4 muscarínico acetilcolina (■) y enfermedad de Parkinson (■). 56

Figura 25. Red de interacciones de las proteínas que interactúan con el canal GIRK4 (en rojo) obtenido del programa STRING. Los colores de las proteínas son los que el programa otorgó de manera arbitraria. Aquellas donde se observa una estructura en su interior, significa que ya se conoce o se predice cómo es su estructura tridimensional..... 57

4. Índice de tablas

Tabla 1. Programa de PCR	28
Tabla 2. Condiciones de la reacción de ligación.....	31
Tabla 3. Nombre, descripción y código de UniProtKB de las proteínas identificadas en el análisis proteómico y seleccionadas por su posible relevancia.....	52

5. Resumen

El canal GIRK4 pertenece a una familia de canales de potasio rectificadores entrantes que se activan por efecto de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Gi heterotrimérica en las células eucariotas. Estos canales iónicos se caracterizan por permitir el influjo de potasio en la membrana plasmática y, en consecuencia, inhiben la excitabilidad celular. Los canales GIRK son heterotetrámeros y forman un poro por el que se transporta potasio. Se han encontrado los heterotetrámeros de GIRK2/GIRK4 y GIRK1/GIRK4 en el cerebro y GIRK1/GIRK4 en la aurícula del corazón; sin embargo, el GIRK4 también es funcional como homotetrámero.

Los canales GIRK se expresan en células no excitables como son las plaquetas, los óvulos y las glándulas suprarrenales. Se ha descubierto que algunas enfermedades, como el síndrome QT largo y el hiperaldosteronismo, están asociadas a mutaciones en la secuencia del canal GIRK4. Se ha detectado el transcrito del canal GIRK4 en células cancerosas de pulmón y de mama, pero se desconoce su papel fisiológico en estas condiciones. Por esta razón, surge la necesidad de determinar las proteínas que interactúan y/o regulan la expresión del canal GIRK4, además de los receptores acoplados a la proteína Gi.

El objetivo de este trabajo fue identificar el interactoma del canal GIRK4 en un cultivo de células de riñón HEK293T. Se subclonó el canal GIRK4 de rata en un vector de expresión de células de mamífero. Para este propósito, se diseñaron oligonucleótidos para subclonar al canal y ligarlo a un vector de expresión de mamíferos. La secuencia del canal se conservó dentro del marco de lectura. Se purificó el DNA para su transfección en células de riñón de humano HEK293T. Por Western Blot se confirmó la expresión y el peso de la proteína con el anticuerpo policlonal GIRK4 (Alomone labs) y el anticuerpo monoclonal para la proteína verde fluorescente EGFP (Clontech). Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de GIRK4 y de electroforesis en un gel de poliacrilamida en una dimensión. Se fragmentaron las proteínas para obtener péptidos para analizarse por UPLC acoplado al espectrómetro de masas (Waters) en el laboratorio LaNSE del

Cinvestav. Se identificaron 632 proteínas con el programa ProteinLynx Global SERVER v3.0.3 software (Waters).

6. Antecedentes

6.1 Canales iónicos

Las células poseen una membrana plasmática que las limita de su entorno. Esta membrana tiene una estructura de bicapa lipídica anfipática en donde se localizan proteínas que permiten el intercambio de moléculas o iones de la célula, ya que su composición es impermeable a la mayoría de estas moléculas hidrofílicas [Alberts *et al.*, 2004]. Las proteínas que permiten el intercambio de iones son los transportadores, los canales iónicos y los receptores ionotrópicos [Gong *et al.*, 2007].

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que conectan el citosol con la parte externa de las células. Estas proteínas forman poros estrechos y presentan una gran selectividad a iones como K^+ , Ca^{2+} , Na^+ o Cl^- [Hille, 2001]. Los canales pueden dejar pasar hasta 100 millones de iones por segundo en su estado abierto, aunque en la realidad duran abiertos unos cuantos milisegundos. El transporte que realizan se le denomina pasivo porque los iones se mueven a favor de su gradiente electroquímico [Alberts *et al.*, 2004].

De acuerdo al estímulo que permite la apertura de los canales iónicos, éstos se clasifican en activados por: ligando, tensión, químicos (neurotransmisores) y voltaje. Además, los canales iónicos también pueden regularse por fosforilación [Alberts *et al.*, 2004, Aidley & Stanfield, 1998].

La selectividad iónica de los canales iónicos se refiere a la capacidad de diferenciar un ion de otro, sin esta capacidad, las señales eléctricas en sistemas biológicos no existirían. Esto es debido a que poseen un filtro de selectividad a un catión específico, además regulan la velocidad con la que entran los iones.

Los canales iónicos participan en múltiples eventos celulares y fisiológicos: establecen el potencial de membrana en reposo, permiten la generación de impulsos eléctricos, participan en el ritmo cardíaco, en la liberación de neurotransmisores, en la contracción muscular y en las células excitables, pero también, se localizan en células no excitables como son los tejidos de las glándulas suprarrenales, pulmón, los ovarios, riñón, hígado, entre otros [Hille, 2001; Leviatan & Kaczmarek, 2002]. Se han descrito alrededor de 400 genes que codifican para canales iónicos en el humano [Huang y Jan, 2014].

Los canales iónicos no son exclusivos del reino animal, sino en todo tipo de organismos. En procariontes tienen un papel importante en el crecimiento celular y la supervivencia; en plantas son de importancia en la comunicación celular [Fromm & Lautner, 2007].

6.1.1 Canales de potasio (K^+)

Los canales de K^+ son los más comunes de la diversa familia de canales iónicos. Además, se encuentran tanto en células excitables como no excitables. Los canales son muy antiguos ya que al secuenciar el genoma de varios seres se descubrió que están presentes en células eucariontes, bacterias y arqueas [Hille, 2001].

En comparación con otros iones, el K^+ se encuentra en mayor concentración dentro de la célula (155 mM) que en el exterior (4 mM). El potencial de membrana de la mayoría de las células es similar al potencial de equilibrio del K^+ (-98 mV) ya que las membranas en reposo son permeables al K^+ [Bolsover *et al.*, 2004]

Los canales de potasio están compuestos de subunidades alfa y subunidades beta, la subunidad alfa es la que forma el conducto para que pase el ion a través de la membrana.

Los canales iónicos se pueden agrupar en familias y subfamilias, clasificación que depende de su estructura y propiedades fisiológicas. Existen cuatro familias principales que dependen del número de segmentos TM de la subunidad α sumado con el número de regiones formadoras de poro (P): 2 segmentos TM con un poro (2TM/1P), 4 segmentos con 2 poros (4TM/2P), 6 segmentos con un poro (6TM/1P) y 8 segmentos TM con 2 poros (8TM/2P) [Bigging *et al.*, 2000].

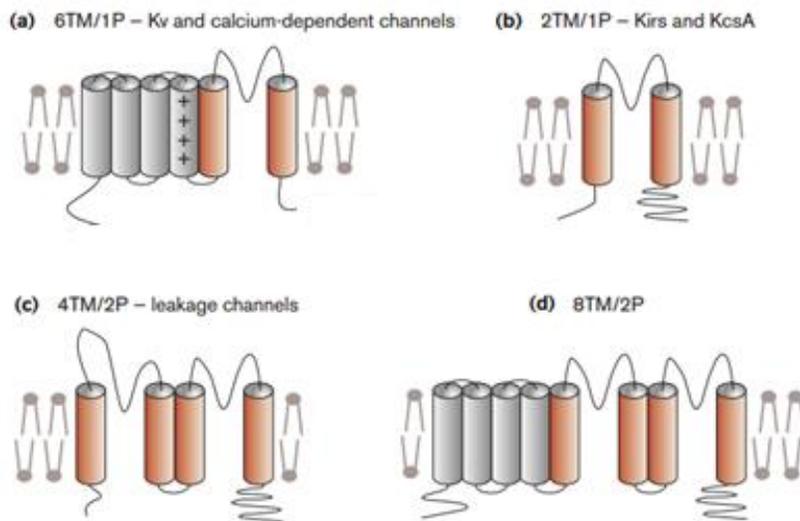


Figura 1. Las 4 principales familias de canales de potasio. Los cilindros representan los segmentos TM y la región formadora de poro se representa como un bucle por encima. a) Familia con 6TM/1P que incluye a los canales dependientes de calcio y los que se abren por voltaje. En el segmento TM 4 tiene signos positivos que hacen referencia a la sensibilidad que tiene al voltaje. b) Familia con 2TM/1P que incluye a los kirs. c) Familia con 4TM/1P a la cual pertenecen canales de unión o de fondo porque conducen iones dependiendo de la concentración extracelular de potasio y son independientes de voltaje. d) Familia con 8TM/2P, sólo se ha encontrado un canal en levaduras. Modificada de Bigging *et al.*, 2000.

Por lo general un canal de potasio completo es un tetrámero con un poro en el caso de las familias 2TM/1P y 6TM/1P, o puede ser un dímero con un poro como sucede en las familias 4TM/2P y 8TM/2P [Huang y Jan, 2014].

En el poro hay una secuencia de residuos de aminoácidos (TVGYG) que recibe el nombre de filtro de selectividad. Su función es permitir el paso de K^+ a través de la membrana en lugar de otros iones como el Na^+ [Doyle *et al.*, 1998; Mackinnon, 2003].

6.1.2 Los canales Kir

Existen diversas familias de canales de K^+ , una de ellas son los canales de potasio rectificadores entrantes activados por la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (inwardly-rectifier potassium ion channel, Kir). La familia Kir es responsable de establecer el potencial de membrana en reposo de la célula (E_m), por lo que al estar abierto permite el movimiento de iones siempre a favor del potencial electroquímico [Hagiwara & Takahashi, 1974; Hagiwara *et al.*, 1976]. Los canales rectificadores son de una única dirección, quiere decir que los iones potasio se mantienen en equilibrio, o bien hay un flujo de iones al hacer más negativo el potencial de membrana cuando están abiertos. La rectificación de los canales Kir está asociada al bloqueo del poro, hacia voltajes despolarizantes; la disminución de la conducción iónica está asociada a la unión intracelular de Mg^{2+} o a la unión de poliaminas al poro en su cara al citosol. Por lo tanto, los canales Kir tienen una conductancia mayor hacia voltajes hiperpolarizantes y no permiten el flujo de iones a voltajes más positivos que el potencial de equilibrio para K^+ , salvo para los canales Kir1 o ROMK, que permiten una corriente saliente de potasio. Se les nombra rectificadores porque se asemejan mucho a los diodos rectificadores usados en electrónica [Corzo, 2005]. Sin embargo, esta rectificación puede ser variada en distintas subfamilias, si se trata de una de un canal rectificador fuerte, solo permitirá el flujo de iones en un sentido, si es un rectificador débil permitirá el flujo de iones en ambos sentidos, pero con magnitud reducida en voltajes despolarizantes.

Los Kir pueden abrirse o activarse por distintos efectores como el pH, ATP, algunos fosfolípidos y las proteínas diméricas $G\beta\gamma$ [Bichet *et al.*, 2003; Ruppersberg, 2000; Hibino, 2010; Hagiwara, 1978]. De manera indirecta, los canales pueden ser modulados por receptores metabotrópicos sensibles a hormonas, neurotransmisores y metabolitos celulares [Hille, 2001].

6.1.3 Estructura de los canales Kir

Esta familia tiene dos segmentos TM, M1 y M2, y un poro. Entre los segmentos se encuentra el poro, el cuál presenta el filtro de selectividad al K⁺ [Bichet *et al.*, 2003].

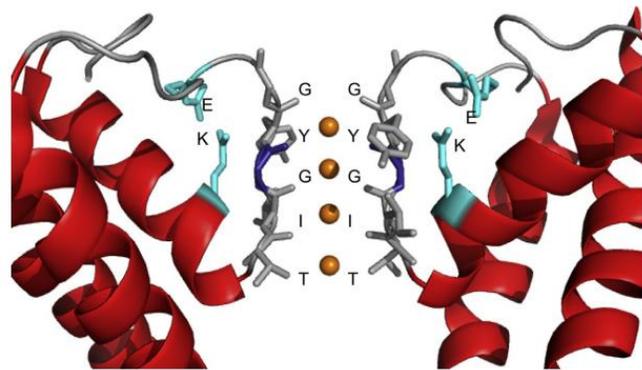


Figura 2. Estructura del filtro de selectividad del GIRK2. Tomada de Glaaser & Slesinger, 2015.

En la figura 2 se observa los residuos de los aminoácidos en el centro. Los monómeros de enfrente y detrás se eliminaron para apreciar mejor. Las esferas son representaciones de iones de K⁺.

6.1.4 Clasificación de los Kir

En 1995, el grupo de Doupnik clasificaron a los canales Kir en subfamilias dependiendo de la homología de la secuencia de aminoácidos y sus propiedades. La familia Kir tiene 7 subfamilias que comprenden desde Kir1.x hasta Kir7.x

- Kir1.x o ROMK. Se tratan de rectificadores débiles, con un sitio de unión a fosfatos en la región de C-terminal y forman homomultímeros [Ho *et al.*, 1993, Lu y Mackinnon, 1994].

- Kir2.x o IRK. Se tratan de rectificadores fuertes que forman homomultímeros funcionales [Kubo *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1995].
- Kir3 o GIRK. Son rectificadores fuertes y forman heteromultímeros. Se activan por proteínas G [Kubo *et al.*, 1993].
- Kir4. Forman homomultímeros y son sensibles al pH intracelular [Bond *et al.*, 1994; Tanemoto *et al.*, 2002].
- Kir5. Forman homotetrámeros y son sensibles al pH intracelular [Bond *et al.*, 1994; Tanemoto *et al.*, 2002].
- Kir6 o KATP. Están asociados a los receptores de sulfonilurea, se agrupan en homomultímeros y son dependientes de ATP [Tarasov *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 2002].
- Kir7. Canales de rectificación débil [Krapivinsky *et al.*, 1998; Partiseti *et al.*, 1998].

6.2 Receptores acoplados a las proteínas G

Los receptores acoplados a las proteínas G pertenecen al grupo más grande y diverso de receptores de membrana en células eucariotas. También se le conocen como receptores de siete segmentos transmembranales. Son polipéptidos únicos de estructura globular y se encuentran inmersos en la membrana celular. Poseen 7 segmentos TM con tres bucles dentro y tres afuera de la célula. El N-terminal se encuentra en el exterior donde las moléculas que dan la señal se ligan y el C-terminal se encuentra en el citosol que va ligado a la proteína G. Se estimulan por fotones, péptidos, lípidos, azúcares y otras proteínas que proviene del exterior de la célula. [O'Connor & Adams, 2010].

Son de gran importancia ya que la mayoría de los fármacos van dirigidos a los receptores para tratar enfermedades como desórdenes del sistema nervioso central, desbalances en el metabolismo, enfermedades cardíacas, cáncer, entre otras. Por lo tanto, su estudio no solamente es para entender su papel en la cascada de señalizaciones, sino también para crear nuevos fármacos.

6.3 Proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas de 3 subunidades, la alfa (α), la beta (β) y la gama (γ). Cuando se disocia la proteína G, se forma un dímero estable ($G\beta\gamma$) [Neer, 1995].

La subunidad $G\alpha$ tiene sitios de unión para el guanósín difosfato GDP y el dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor acoplado a las proteínas G se activa, se promueve el intercambio de GDP por guanósín trifosfato GTP y la separación de la subunidad $G\alpha$ GTP tanto del receptor como del dímero $G\beta\gamma$. Estas subunidades libres modulan la actividad de efectores como las enzimas y los canales iónicos. La señalización termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ que convierte el GTP en GDP. El trímero se asocia de nuevo y regresa a su estado basal [Wettschureck & Offermanns, 2005].

La proteína G que interactúa con la familia de canales GIRK es $G_{ai}/G_{\alpha 0}$ que inhibe a la enzima adenilato ciclasa.

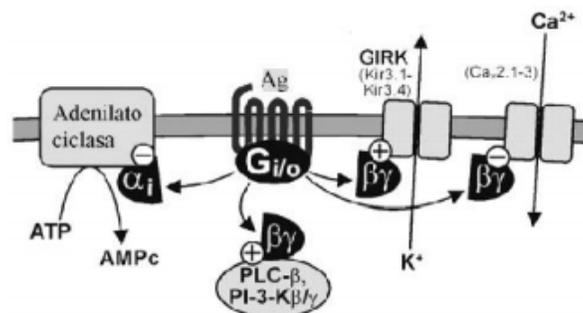


Figura 3. Vía de señalización de las proteínas $G_{ai}/G_{\alpha 0}$. Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005.

Primero, el agonista (Ag) activa al receptor, lo que causa cambios conformacionales en las proteínas G y el intercambio de GDP por GTP en la proteína G, específicamente en la subunidad $G\alpha$. El trímero $G\alpha\beta\gamma$ se disocia y la subunidad $G\alpha$ se asocia a la enzima adenilato ciclasa y la inhibe, mientras que el

dímero G $\beta\gamma$ puede activar a los canales de potasio Kir3 y los canales de calcio dependientes de voltaje.

Las proteínas G heterotriméricas tipo Gi/o son sensibles a fosfatidil inositol, Na⁺, proteínas receptoras acopladas a las proteínas G y a la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Las subunidades G- β 1 y G- γ 2 son las que principalmente se unen a las regiones amino y carboxilo terminal de los GIRK para que se puedan activar.

6.4 Subfamilia Kir3 o GIRK

La subfamilia Kir3 abarca a los canales de potasio rectificadores entrantes activados por la proteína Gi/Go, en específico el dímero $\beta\gamma$. Esta subfamilia comprende a cinco canales con esta característica. Estos canales han sido clonados: el GIRK1 como el GIRK4 del nodo sinoauricular de ratón y rata, el GIRK2 y el GIRK3 del cerebro de ratón y el GIRK5 de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Kubo *et al.*, 1993; Krapivinsky *et al.*, 1995; Lesage *et al.*, 1994; Hedin *et al.*, 1996].

La mayor diferencia entre los cinco canales está en las regiones del amino y el carboxilo terminal. La secuencia de aminoácidos del canal GIRK4 humano presenta un 78% de identidad con el GIRK5 (ovocitos de *Xenopus Laevis*), 89% con el GIRK2 humano, 83% con el GIRK3 humano y 68% con el GIRK1 humano [Spauschus *et al.*, 1996].

Los receptores acoplados a las proteínas Gi/G_o que activan a los canales GIRK son: el muscarínico m₂, el adrenérgico α ₂, el dopaminérgico D₂, el de serotonina 5HT_{1A}, el de adenosina A₁, el de GABAB, el de esfingosina 1-fosfato, el de somatostatina y los opioides κ , μ y δ [Werner *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2001; Hille, 2001].

Se ha reportado que antidepresivos tricíclicos y fármacos antipsicóticos como imipramina, amitriptilina, clomipramina, desipramina, etc., también inhiben a los canales GIRK1, GIRK2 y GIRK4 del sistema nervioso [Kobayashi *et al.*, 2004]. Esta acción tiene efectos terapéuticos y elimina convulsiones y arritmias auriculares. Los canales GIRK también se activan directamente con etanol [Kobayashi *et al.*, 1999] mientras que la cocaína los inhibe. Otras sustancias como cafeína, cannabinoides, alucinógenos, opioides y anfetaminas también tienen efectos, pero de manera indirecta, ya que requieren las vías de transducción de señales, mediante receptores acoplados a proteínas Gi/o [Sugaya *et al.*, 2013],

6.5 GIRK4 (Kir3.4)

También llamado CIR (cardiac inward rectifier) el gen que codifica a esta proteína es KCNJ5 y la proteína tiene un peso molecular de 47.668 kDa. Se encuentra en numerosas células de órganos como: corazón, las glándulas suprarrenales, páncreas, pulmones y el apéndice (Datos disponibles en: v18.1 <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120457-KCNJ5/tissue>).

En el corazón, la estimulación del nervio vago disminuye la frecuencia cardiaca debido a que se libera acetilcolina que se une a los receptores muscarínicos, por lo que provoca la disociación de la proteína Gi y activa a los canales de potasio IK_{ACh}. A pesar de que esta actividad es imperceptible en un corazón sano, se observa mayor actividad en enfermedades cardiacas como la fibrilación auricular.

En el ser humano la mayor concentración del canal GIRK4 está en las glándulas suprarrenales, sin embargo, hay poca información sobre el papel del canal en la fisiología de las glándulas. En el estudio de Hardege *et al.*, (2018) se identificó que participa en la regulación de aldosterona y, por ende, en la presión arterial.

6.5.1 Enfermedades relacionadas con la expresión del canal GIRK4.

Se ha reportado que mutaciones en este canal producen adenomas que propician el desarrollo de hiperaldosteronismo familiar tipo III. El hiperaldosteronismo familiar tipo III es una enfermedad cuyos síntomas son hipertensión y una elevada producción de aldosterona; además se presenta hipokalemia y niveles elevados de 18-oxocortisol y 18-hidroxicortisol [Geller *et al.*, 2008]. Por lo general, estos síntomas se presentan en la niñez en la mayoría de los casos. Se han encontrado mutaciones en el canal GIRK4 que eliminan la selectividad por el ion K^+ e incrementan la conductancia al Na^+ como Thr158Ala, que se ubica cerca de la región del filtro de selectividad, en consecuencia, se despolariza de forma permanente la membrana celular [Choi *et al.*, 2011]. La despolarización permite que se abran canales de Ca^{2+} lo cual estimula la producción y liberación de aldosterona al plasma [Prada *et al.*, 2017]. Otras mutaciones que afectan el filtro de selectividad son: Gly151Arg y Leu168Arg [Choi *et al.*, 2011].

El síndrome QT largo tipo 13 es un desorden cardiaco heredado que provoca arritmias ventriculares polimórficas con un intervalo prolongado de la onda QT en el electrocardiograma. Esta enfermedad se produce por mutaciones en el gen KCNJ5 que codifica para el canal GIRK4. La mutación que se han descrito es Gly387Arg que, curiosamente se encuentra alejado del filtro de selectividad, pero provoca un problema de tráfico del canal a la membrana plasmática de las células del nodo sinoauricular [Yang *et al.*, 2010].

El transcrito del canal se ha detectado en varias líneas celulares cancerígenas como U-937 (de linaje mielóide obtenidas de un linfoma), RH-30 (sarcoma en médula espinal), HeLa (cáncer cervical), entre otras (Datos disponibles en: v18.1 <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120457-KCNJ5/cell>). También, se ha encontrado en células cancerígenas de mama donde este canal está involucrado en la señalización celular [Dhar & Plummer, 2006].

6.6 Proteómica

La proteómica comprende el análisis del complemento proteico en condiciones específicas de una célula, tejido u organismo. El término *Proteomics* surgió en 1997 pero en 1994 apareció el término *proteome* cuando Mark Wilkins combinó las palabras *protein* (proteína) y *genome* (genoma). La proteómica tiene como objetivo estudiar los proteomas. El proteoma es el resultado de un análisis complejo con el que se muestran todas las proteínas identificadas bajo cierta condición y tiene la característica de ser dinámico ya que depende del ambiente y las condiciones de la célula u organismo [Mine *et al.*, 2009].

Gracias a estudios proteómicos se puede inferir cómo es que las proteínas trabajan en conjunto para realizar sus funciones, lo que da paso a entender la fisiología y los procesos biológicos en los seres vivos. Las herramientas proteómicas se han utilizado para identificar biomarcadores con aplicaciones clínicas y el conocimiento de las características de enfermedades complejas como el cáncer o enfermedades degenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington.

Para el desarrollo de la proteómica tuvo que existir dos factores cruciales: la secuenciación de los genomas y el desarrollo de técnicas para la separación y análisis de proteínas. A diferencia de los genomas, que es poco probable que se modifiquen a lo largo del tiempo, las proteínas que posee un organismo varían según las condiciones en las que se encuentra al ser analizado. Para sintetizar una proteína primero se realiza la transcripción del mRNA, después se traduce el mRNA para generar una proteína y, por último, se llevan a cabo modificaciones postraduccionales. Durante este proceso pueden suscitarse errores como la degradación del transcrito o la ineficiente traducción que generen una proteína cuya actividad sea deficiente o nula. Es por esto por lo que no es suficiente conocer el genoma, sino también, las proteínas que se sintetizan y cómo interactúan entre ellas [Shah & Misra, 2011].

Una forma de determinar el proteoma incluye el fraccionamiento de proteínas, espectrometría de masas (MS) y la bioinformática. Primero se separan las proteínas de interés de las células, después se lisan y se separan en un gel de poliacrilamida de una o dos dimensiones. Posteriormente, las proteínas se cortan en péptidos con la enzima tripsina y se realiza la separación de los péptidos de acuerdo a su polaridad en un UPLC. La muestra ya separada se introduce en el ionizador por electrospray que ioniza los péptidos y los separa en función de su masa/carga. Así, se identifican las proteínas presentes en la muestra. Por último, los datos se analizan con programas bioinformáticos [Yu *et al.*, 2010].

La espectrometría de masas se ha utilizado en el estudio de la estructura de proteínas solubles y los datos obtenidos se complementan con otras técnicas como la resonancia magnética nuclear, microscopía electrónica, difracción de rayos X, entre otras [Samways, 2014]. Esto es posible ya que la espectrometría de masas es capaz de generar datos a gran escala, realizar su análisis y al final, poder llevar a cabo la validación de los resultados. También, se utiliza para elucidar las interacciones de las proteínas, hacer análisis “top down”, que es un análisis de la información, realizar el procesamiento de los datos en informática de proteínas intactas y brindar perspectivas para investigaciones clínicas [Yu *et al.*, 2010].

6.7 Programas bioinformáticos

La bioinformática es un campo interdisciplinario que involucra la biología molecular y genética con las ciencias de la computación, matemáticas y estadística [Can, 2014]. El término *Bioinformatics* (bioinformática) fue acuñado por Paulien Hogeweg en 1970 que combinó las palabras *biology* (biología) y *information technology* (tecnología de la información). La bioinformática tiene como propósito almacenar y organizar información recopilada de investigaciones para que pueda ser de fácil acceso y también, crear e implementar herramientas de software y algoritmos para el análisis y la interpretación de los datos.

En este trabajo se recurrió a programas bioinformáticos online como STRING, PANTHER y Human Protein Atlas.

STRING (Versión 11.0) es un programa que reúne información y predice las interacciones proteína-proteína y es parte de ELIXIR infrastructure. Las interacciones que toma en consideración son físicas o funcionales. Esta información proviene de 5 fuentes: predicciones de contexto genómico, experimentos de laboratorios, co-expresión, mención en la literatura y conocimientos previos en bases de datos.

PANTHER (Protein ANALysis Through Evolutionary Relationships) es un programa que clasifica a las proteínas y sus genes para facilitar el análisis y usa algoritmos bioinformáticos sofisticados. La versión 14.0 contiene 15512 familias de proteínas.

Human Protein Atlas (versión 18.1) es un programa que reúne información proveniente de varios estudios “omicos” para realizar mapas de todas las proteínas del ser humano ya sea en células, tejidos y órganos. La información que se muestra en el programa se recopiló de numerosas publicaciones sobre la biología del ser humano y se seleccionó por la organización ELIXIR. Cabe destacar que toda la información en el programa es de libre acceso.

Estos programas obtienen la información de bases de datos como Uniprot, REACTOME, *Gene Ontology*, ELIXIR, entre otros.

7. Justificación

El canal de potasio GIRK4 ha sido ampliamente estudiado en el corazón y el cerebro. Sin embargo, el canal GIRK4 se expresa en algunos tejidos no excitables tales como: las glándulas suprarrenales, el riñón, el pulmón y el ovario. Las mutaciones del canal GIRK4 se relacionan con el síndrome QT largo y el hiperaldoosteronismo familiar tipo III. A la fecha, no se conoce el papel fisiológico del canal GIRK4 en los tejidos no excitables en condiciones fisiológicas. La cascada de señalización de la familia de canales GIRK se conoce en los tejidos excitables, pero no se ha descrito en los tejidos no excitables. Por otra parte, tampoco existen reportes de ensayos proteómicos de los canales GIRK.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Identificar el interactoma del canal GIRK4 en un cultivo de células de riñón HEK293T.

8.2 Objetivos particulares

- I. Subclonar el canal pBluescript SK-/GIRK4 (vector de expresión para ovocitos) en el vector EGFP-C1 (vector de expresión para las células de mamífero).
- II. Transfectar el canal pEGFP-C1/GIRK4 en las células de riñón de humano HEK293T.
- III. Comparar por ensayos de Western Blot la especificidad de los anticuerpos para el canal GIRK4 y el anticuerpo para la proteína verde EGFP (pEGFP-GIRK4).
- IV. Realizar ensayos de inmunoprecipitación y electroforesis en un gel de poliacrilamida de una dimensión, para la obtención de la muestra y realizar su análisis por UPLC-MS.
- V. Hacer el análisis de los datos obtenidos del ensayo proteómico utilizando programas de bioinformática.

9. Hipótesis

El análisis del interactoma del canal de potasio GIRK4, revelará redes de proteínas que conduzcan a la identificación de nuevas proteínas, y así, comprender el papel de los canales GIRK en tejidos no excitables.

10. Procedimiento experimental

10.1 Subclonación del gen del canal GIRK4

10.1.1 Biología Molecular

El DNA del canal GIRK4 se encuentra ligado al vector pBluescript SK⁻, para su expresión en los ovocitos. Se tiene el mapa del vector pBluescript SK⁻ para analizar el sitio múltiple de clonación y el antibiótico para seleccionar las colonias.

Mediante ensayos con las enzimas de restricción, se determinó cuáles enzimas cortaban a la secuencia del canal y/o el vector. Se realizaron digestiones enzimáticas con las enzimas XbaI, Sall, BamHI y EcoRI y se observaron las bandas en geles de agarosa al 1%.

Se transformaron bacterias (ver anexo) de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* donde se incorporó el DNA del canal GIRK4 insertado en el vector pBluescript SK⁻. Posteriormente, se realizó una midipreparación QIAGEN (ver anexo) para la extracción y purificación del DNA. Por último, se determinó la concentración del DNA por medio de espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

10.1.2 Reacción de la PCR

Se diseñaron dos oligonucleótidos el GIRK4Sallup y el GIRK4Xballow que se adquirieron del Instituto de Biotecnología, UNAM, en Cuernavaca, Morelos.

GIRK4Sallup 5' a 3'

CATCGTC**GACATGGCCGGTGATTCTAGGAATGCTATG**

GIRK4Xballow 5' a 3'

ATTTT**CTAGATCACATTGAGCCCCTTGTTGCCCGGGA**

Se amplificó la secuencia que codifica para el canal GIRK4 mediante una reacción de PCR. La reacción de PCR contenía:

29 μL de agua BM

5 μL de Buffer 10x de la enzima Taq polimerasa

1.5 μL de MgCl_2 50 mM

1 μL de dNTP's 10 mM

0.5 μL de la enzima Taq polimerasa 10x (Invitrogen)

5 μL de DMSO

2 μL del oligonucleótido GIRK4Sallup 10 μM

2 μL del oligonucleótido GIRK4Xballow 10 μM

4 μL de DNA del plásmido pBluescript SK-/GIRK4 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

El volumen total de la reacción fue de 50 μL .

La reacción de PCR se corrió en el termociclador Veriti de Applied Biosystems. Se utilizó el siguiente programa:

Tabla 1. Programa de PCR

Pasos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (minutos)
1.	94	5
2.	94	1
3.	54	1
4.	72	1:30
5.	72	10
6.	4	∞

Del paso 2 al 4 se repitieron por 30 ciclos.

Se realizaron 4 reacciones de PCR para obtener suficiente fragmento. De cada reacción se tomaron 3 μ L para identificar las bandas amplificadas en un gel de agarosa al 1% (ver anexo). Por el peso de la banda, se identificó el peso del canal GIRK4 en todas las reacciones y se purificó el DNA (ver anexo).

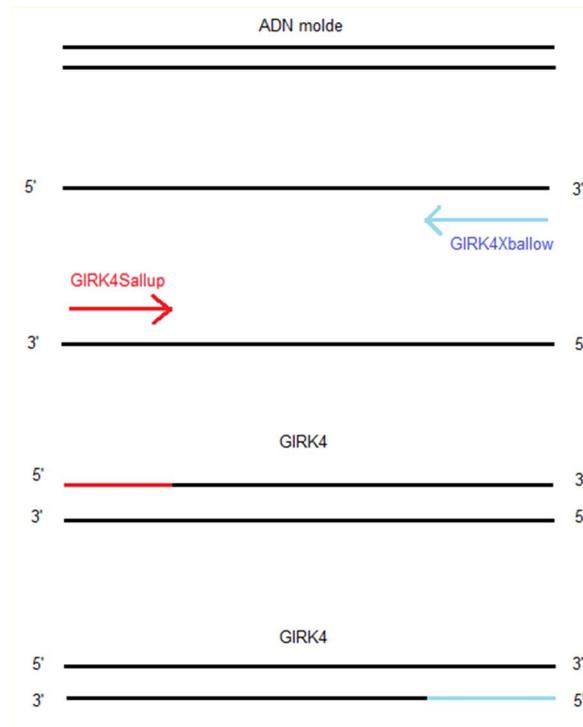


Figura 4. Esquema de la amplificación de la secuencia de DNA utilizando la PCR. Se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron. Ya que se amplificó la banda deseada, se purificó para poder llevar a cabo la ligación con el plásmido pEGFP-C1.

Para poder ligar el fragmento amplificado con el vector pEGFP-C1, se realizó la digestión del DNA amplificado con las enzimas de restricción Sall y Xbal en la reacción siguiente:

25 μ L de PCR purificado

3 μ L de buffer M 10x

2 μ L de enzima Xbal (Invitrogen)

Se incubó a 37 °C por 1:30 horas y posteriormente se agregaron:

5 μ L de agua BM

3 μ L de buffer H 10x

2 μ L de enzima Sall (Invitrogen)

Se incubó a 37 °C por 1:30 horas.

Al mismo tiempo, el vector pEGFP-C1 Dam^r se digirió con las mismas enzimas de restricción en la reacción siguiente:

15 μ L de agua BM

10 μ L de DNA purificado de pEGFP-C1 0.6 μ g/ μ L

3 μ L de buffer M 10x

2 μ L de enzima Xbal (Invitrogen)

Se incubó a 37 °C por 1:30 horas y posteriormente se agregaron:

5 μ L de agua BM

3 μ L de buffer H 10x

2 μ L de enzima Sall (Invitrogen)

Volumen total 40 μ L.

Se incubó a 37 °C por 1:30 horas.

Al terminar la reacción, se corrió un gel de agarosa al 1% (ver anexo) y se purificaron las bandas del vector y del canal a partir del gel (ver anexo).

10.1.3 Reacción de ligación

Ya que se purificaron el fragmento y el vector se realizaron dos reacciones dependiendo de su presencia cualitativa en el gel:

1:1

9 μ L DNA del vector : 3 μ L DNA del fragmento

1:3

9 μ L DNA del vector : 9 μ L DNA del fragmento

Tabla 2. Condiciones de la reacción de ligación.

	1:1	1:3
Agua BM	5 μ L	0 μ L
Buffer 10x	2 μ L	2 μ L
DNA puro del vector	9 μ L	9 μ L
DNA puro del fragmento	3 μ L	9 μ L
Ligasa	1 μ L	1 μ L
Volumen final	20 μ L	21 μ L

Se incubó a la reacción toda la noche a TA.

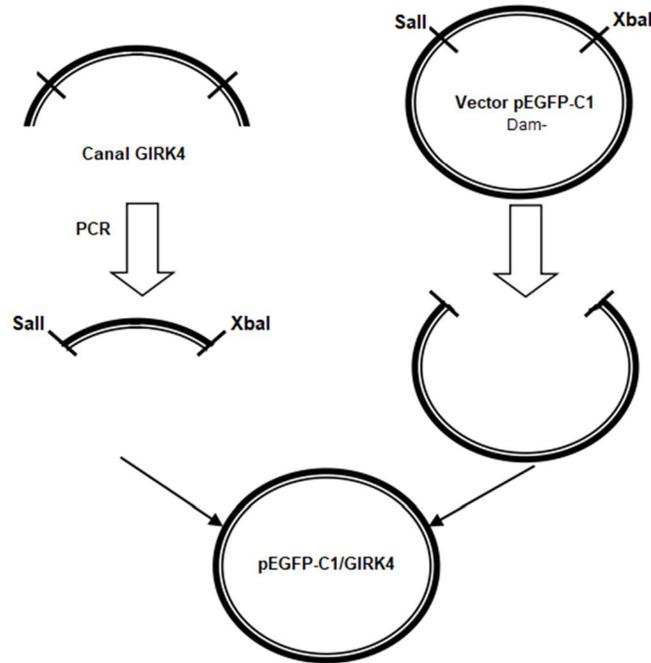


Figura 5. Esquema general de la subclonación del canal GIRK4.

10.1.4 Minipreparación QIAGEN para obtención del DNA

Se transformaron bacterias DH5 α competentes con el DNA de las ligaciones (tabla 2).

Se crecieron las células en cajas de LB/agar con kanamicina (ver anexo), teniendo como control una caja de LB/agar sin kanamicina y con kanamicina para las células DH5 α . Se incubaron por 14 horas a 37 °C. Se picó una colonia y se creció en 5 mL de medio LB con kanamicina (ver anexo) por 14 horas a 37 °C. Se hicieron 2 stocks de glicerol con 400 μ L de medio y se guardaron a -70 °C. Se hizo una Miniprep (Qiagen) (ver anexo). Por último, se midió la concentración DNA por espectrofotometría UV (JENWAY6105 U.V./Vis. Spectrophotometer) a una longitud de onda de 260 nm en una celda de cuarzo.

10.1.5 Secuenciación

Para confirmar los resultados de la secuencia del DNA construida, se enviaron las muestras a secuenciar con los oligonucleótidos *GIRK4Sallup* y *GIRK4Xballow* que se utilizaron para subclonar al canal. Se secuenciaron con el método automatizado en el Instituto de Biotecnología, de la UNAM. La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia registrada en el Genbank con la página MultAlin Multiple sequence alignment by Florence Corpet.

10.1.6 Midipreparación para obtención del DNA

Con la secuenciación se corroboraron los resultados, se prosiguió a realizar una midipreparación para obtener mayor cantidad del vector para posteriores experimentos.

Se picaron 4 colonias que crecieron en la misma caja Petri donde se obtuvo el DNA del vector con el canal GIRK4 y se crecieron en 5 mL de medio LB con kanamicina durante 8 horas a 37 °C. Del tubo donde crecieron mejor las bacterias, se tomaron 2 mL y se incubaron en 100 mL de medio LB con kanamicina a 37 °C por 14 horas. Con este cultivo se purificó el DNA del canal con el kit de QIAGEN (ver anexo). Por último, se determinó la concentración DNA por espectrofotometría UV.

10.2 Transfección a células humanas de riñón HEK293T

Las células HEK293T, crecieron en cajas de 100mm y se mantuvieron en 10 mL de medio líquido DMEM (high glucose) adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% v/v de penicilina-estreptomomicina (todos ellos de Invitrogen) a una temperatura de 37°C, en condiciones constantes de humedad y una atmósfera de 5% de CO₂.

Se transfectó un cultivo de células HEK293T con una confluencia entre 70-80% con el DNA del pEGFP-C1/GIRK4, igualmente se transfectó otro cultivo de células con el DNA del pEGFP-C1 utilizando como lípido catiónico PEI (ChemCruz) en un medio reducido en suero, Opti-MEM (Gibco). Brevemente, para cada transfección se ocupó 150 μ L de Opti-MEM y se diluyó PEI (3:1 en relación con el DNA (m/m)) y se incubó durante cinco minutos. En otros tubos, se diluyeron 4 μ g de pEGFP-C1/GIRK4 o pEGFP-C1 con 150 μ L Opti-MEM para cada plásmido. Se adicionó el PEI diluido al DNA diluido. Se incubó a temperatura ambiente durante 25-30 minutos, agitando esporádicamente.

Antes de adicionar la solución de transfección, se retiraron 5 mL de DMEM. Cuidadosamente se adicionó la solución de transfección y se esparció por toda la caja. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de DMEM.

A las 24 horas y 48 horas después de la transfección se observaron si presentaban fluorescencia con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE200. A las 48 horas se lisaron (ver anexo).

10.3 Cuantificación de proteínas

Se realizó una curva de calibración de proteínas con albúmina (Bovine Serum Albumine) en un rango entre 0.06 hasta 2 mg/mL (ver anexo) se utilizó el kit BioRad DC Protein Assay, que es similar al método de Lowry, y las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrómetro UV Thermo Scientific MULTISKAN 60.

10.4 Inmunoprecipitación

10.4.1 Preaclarado de perlas

Se lavaron las perlas de Protein G Sepharose® de buffer RIPA por 3 veces. Se preparó una mezcla con volúmenes iguales de protein G Sepharose y buffer.

Las muestras transfectadas con EGFP (500 µg) y EGFP/GIRK4 (500 µg), se preaclaron con 30 uL de protein G lavadas y se ajustaron a un volumen de 300 uL con buffer RIPA. Las muestras se mantuvieron en agitación durante dos horas a 4 °C. Después, se centrifugó a 16000 4 °C durante un minuto. Se desecharon las perlas de protein G y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le adicionó 5 µg de anticuerpo JL-8 (GFP mouse antibody, Clontech). Se incubó en agitación durante 18 horas a 4 °C. Se separó el sobrenadante de las perlas al centrifugar a 16000 rcf por un minuto a 4 °C y se guardó por separado. Se lavaron las perlas con 200 µL de buffer RIPA por triplicado y por último se lavaron con 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8. Cada lavado se centrifugó a 16000 rcf durante un minuto y se desechó el sobrenadante. El inmunoprecipitado (IP) se resuspendió en 40 µL de PBS-0.01% Tween y se guardó a -20 °C, hasta su uso.

10.4.2 Electroforesis y Western Blot

Las muestras del IP se disolvieron con buffer muestra 2X (Bio-Rad) con 10% β-mercaptotanol (Bio-Rad) y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Se realizó la electroforesis en geles de 8% de acrilamida (ver anexo) en buffer SDS-Tris-glicina (ver anexo) a 120 V durante 30 minutos y después a 150 V durante una hora.

Al finalizar la electroforesis, se hizo la transferencia de proteínas en un transblot semiseco a una membrana (Inmuno Blot PVDF membrane for protein Blotting) a 20 V, 0.12 A durante 45 minutos. Después, se lavó la membrana por triplicado con TBS-0.1 % Tween y se bloqueó con 5% de leche libre de grasa (Bio-Rad) en TBS-0.1% Tween (anexo) durante una hora a TA. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó con TBS-0.1% Tween. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra GFP (1:1500; JL-8, Clontech). Se incubó a 4 °C por 20 horas en agitación lenta. Se lavó con TBS-0.1% Tween por triplicado. El anticuerpo secundario utilizado fue donkey anti-mouse IgG-HRP

(1:7000; Santa Cruz) durante 1 hora en agitación lenta a TA. Finalmente, se detectaron las proteínas con el kit de quimioluminiscencia de Millipore Immobilon Western.

Posteriormente, se removió el anticuerpo de la membrana de PVDF (stripping, ver anexo) con el fin de observar otra proteína. Se utilizó el anticuerpo primario policlonal de conejo específico para GIRK4 (Anti-K_{ir}3.4, 1:800; Alomone labs). El anticuerpo secundario utilizado fue donkey anti-rabbit 1:22000. Las soluciones de anticuerpos se prepararon con leche al 5% en TBS-0.1% Tween.

10.4.4 Tinción con azul de coomassie

Después de la electroforesis los geles se lavaron con agua bidestilada por tres veces durante 10 minutos cada lavado. Se retiró el agua y se añadió 50 mL de azul de Coomassie (Bio-safe Coomassie G-250, Bio-Rad). Se dejó en agitación moderada por una hora y al terminar se lavó 3 veces con agua bidestilada.

10.5 Preparación de la muestra para proteómica.

Cabe destacar que todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar vertical para disminuir la probabilidad de contaminación de las muestras con otras proteínas que pudiesen alterar los datos.

Se transfectaron células HEK293T con el DNA pEGFP-C1/GIRK4 (4 µg). A las 48 horas se lisaron.

Para la inmunoprecipitación se utilizaron perlas magnéticas Dynabeads® Protein G (Invitrogen). Se resuspendieron las perlas con una ligera agitación, se transfirieron 50 µL de las perlas a un tubo y se retiró la solución con ayuda de un magneto. Se agregaron 5 µg de anti-EGFP JL-8 diluido en 200 µL de PBS-0.1% Tween y se incubó en rotación durante toda la noche a TA. Después, se removió el sobrenadante. Las perlas magnéticas se resuspendieron en 200 µL de PBS-

0.1% Tween y se lavaron por pipeteo suave. Igualmente se eliminó el sobrenadante.

Se agregó la muestra (2 mg/mL) y se mezcló por pipeteo suave para resuspender las perlas. Se incubó por rotación durante 4 horas a TA. Se eliminó el sobrenadante con ayuda del magneto y se guardó en un tubo limpio para su posterior análisis. Se lavaron las perlas magnéticas tres veces con 200 μ L de buffer Tris 50 mM pH 8. Con el magneto se separaron las perlas del sobrenadante.

Las perlas magnéticas se resuspendieron en 27 μ L de buffer de elución (NuPAGE® LDS Sample buffer 4X) y 3 μ L de agente reductor (NuPAGE® Sample reducing agent). Se mezclaron suavemente para resuspender las perlas con el complejo. Se calentó la muestra a 70 °C durante 10 minutos. Se colocó el magneto para separar el sobrenadante y colocarlo en un pozo del gel.

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

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

10.6 Proteómica

La muestra se llevó al laboratorio LaNSE del Cinvestav donde se trató el gel para obtener las proteínas. Se cortaron las bandas del gel, se decoloraron con solución de desteñido (50% metanol y 2.5% de ácido fórmico en agua MilliQ) y se deshidrató el gel con acetonitrilo. Para llevar a cabo la reducción de las proteínas se agregó DTT 100 mM y para la alquilación se agregó solución IAA 50 mM. Se eliminaron los restos de las disoluciones con bicarbonato de amonio 100 mM. Se

volvió a deshidratar el gel y se rehidrató con bicarbonato de amonio. Se le añadió 20 ng/ μ L de tripsina y ya que fue absorbida por el gel, se le agregó bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó a 37 °C toda la noche. Al otro día se le añadió la solución de ácido fórmico al 5% en agua MilliQ para extraer los péptidos y después una solución de ácido fórmico 5% con 50% de acetonitrilo en agua MilliQ. Al final se evaporó la muestra hasta tener 20 μ L y se conservó a -20 °C.

La muestra se introdujo en una precolumna Symmetry C18 Trap V/M (Waters, Milford, MA) y se utilizó como fase móvil A 0.1 % de ácido fórmico en agua y fase móvil B 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Los péptidos se separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA). Los datos del espectro se obtuvieron de un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y separación de movilidad iónica Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA).

Los datos obtenidos del espectrómetro de masas fueron analizados usando ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 software 2 (Waters, Milford, MA) contra la base de datos de *Homo sapiens* (71785 secuencias de proteínas descargadas de Uniprot, última modificación 1ro de diciembre del 2017).

Se realizó el análisis de los datos de las proteínas obtenidas con ayuda de los programas bioinformáticos STRING, PANTHER y Human Protein Atlas.

11. Resultados y discusión

11.1 Determinación de la posición y dirección del canal GIRK4 en el vector pBluescript SK-

En el laboratorio se tenía el canal de potasio GIRK4 (Genbank #L35771) subclonado en el vector de expresión para los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*: el pBluescript SK-.

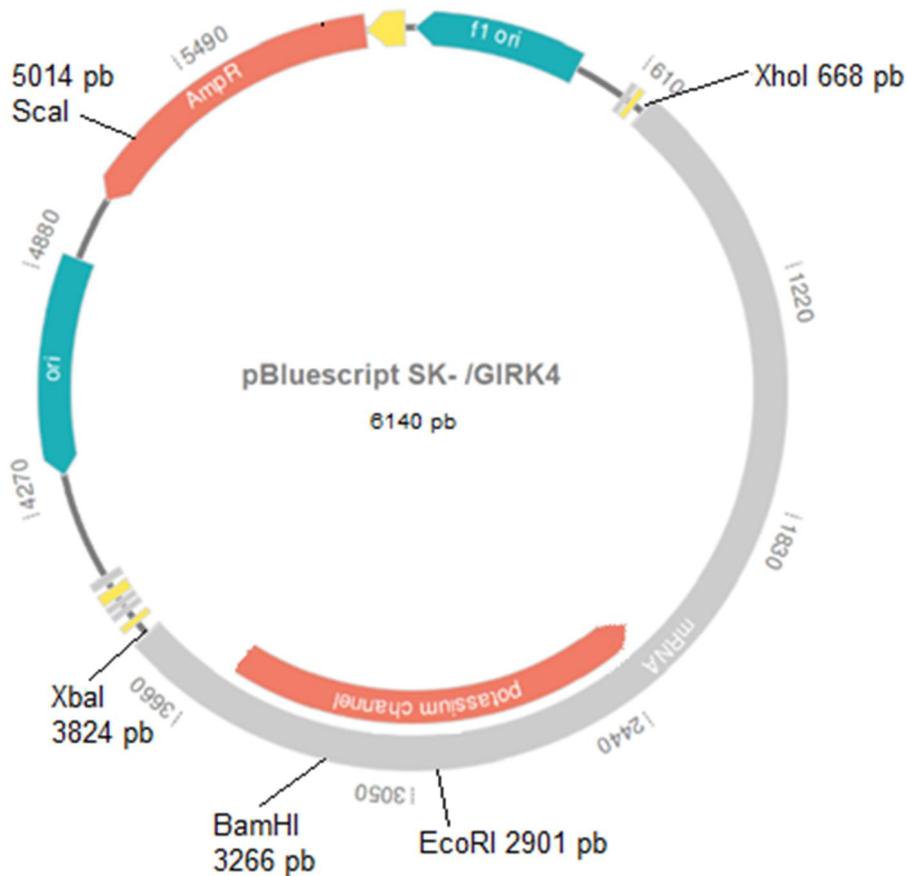


Figura 6. Mapa de la secuencia del canal GIRK4 subclonado en el vector pBluescript SK. Se muestran algunos sitios para enzimas de restricción. La parte gris es la secuencia del GIRK4 y la flecha inferior roja es la secuencia que codifica para la proteína de interés. Se observa que la secuencia del canal está insertada entre XbaI y XhoI. Mapa hecho en GenScript®

Para corroborar las condiciones del DNA plasmídico, se realizaron digestiones enzimáticas con las enzimas de restricción XbaI, XhoI, BamHI y Scal.

Se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE y se trataron las muestras con buffer de corrida y GelRed.

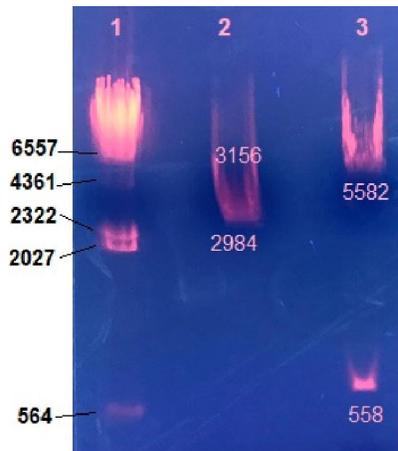


Figura 7. Separación por electroforesis en el que se muestran las digestiones enzimáticas del DNA pBluescript SK-/GIRK4 con XbaI y XhoI (carril 2) y digerido con XbaI y BamHI (carril 3). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.

En el segundo carril (figura 7) se observa una sola banda en 3000 pb, sin embargo, podemos determinar que se tratan de 2 fragmentos: uno de 3156 pb que corresponde al peso del canal GIRK4 y otro de 2984 pb que corresponde al peso del vector pBluescript SK-. En el carril 3 de la figura 7 se observan dos fragmentos: uno de 5582 pb y otro de 558 pb, fragmentos esperados si se cortó con XbaI y BamHI.

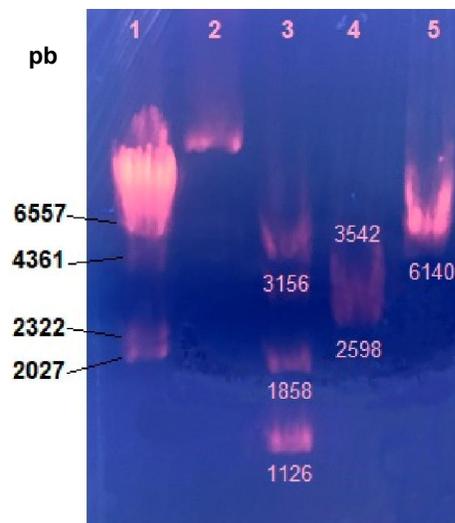


Figura 8. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran las digestiones enzimáticas del DNA pBluescript SK-/GIRK4 íntegro (carril 2), digerido con XhoI, XbaI y Scal (carril 3), digerido con BamHI y XhoI (carril 4) y digerido con XhoI (carril 5). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.

En el carril 2 (figura 8) se observa una banda que corresponde al DNA del canal GIRK4 en el vector pBluescript SK⁻ sin digerir 6140 pb, se observa un peso mucho más alto debido al superenrollamiento del DNA. En el carril 3 de la figura 8 se observan los tres fragmentos esperados: 3156 pb, 1858 pb y 1126 pb. En el carril 4 de la figura 8 se aprecia una banda que no migró de manera uniforme, sin embargo, se ubica entre las bandas de 2322 pb y 4361 pb. Se observaron dos fragmentos de peso similar (3542 pb y 2598 pb). Por último, en el carril 5 de la figura 8 el DNA plasmídico solamente se abrió con la enzima XhoI; el fragmento esperado es de 6140 pb que es el tamaño del vector pBluescript SK⁻ más el canal GIRK4, el cual si corresponde.

Los resultados obtenidos de las digestiones enzimáticas permitieron determinar la dirección en la que se encontraba insertado el canal GIRK4 en este vector.

Posteriormente se analizó el mapa del vector pEGFP-C1 en Addgene para planear la inserción de la secuencia del DNA del canal GIRK4. Los sitios de corte que se escogieron para cortar las secuencias y hacer la ligación del fragmento del canal GIRK4 con el vector pEGFP-C1 fueron aquellos de las enzimas Sall, hacia la región del amino terminal, y XbaI hacia la región del carboxilo terminal, ya que estas enzimas cortan solamente una vez hacia los extremos de la secuencia del GIRK4 y éstas mismas enzimas fueron escogidas del sitio múltiple de clonación del vector pEGFP-C1 donde no se modifica el marco de lectura con lo cual se permite la correcta transcripción y traducción final.

Se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar por PCR solo la región que codifica para el canal GIRK4. El primer o cebador hacia la región amino terminal con el sitio de corte de la enzima Sall y el primer hacia la región carboxilo terminal con el sitio de corte de la enzima XbaI (tamaño del fragmento de 1259 pb).

11.2 Reacción de la ligación

Ya que se realizó la PCR y se purificó el fragmento amplificado, se digirió con las enzimas Sall y Xbal, al igual que el DNA del vector pEGFP-C1. Se confirmó que ambos fragmentos del DNA estaban digeridos al correrlos en el gel de agarosa.



Figura 9. Separación por electroforesis de los fragmentos digeridos del vector pEGFP-C1 (carril 2 y 3) y del fragmento amplificado por PCR (carril 4 y 5). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.

En la figura 9, en los carriles 2 y 3 se observan las bandas del vector pEGFP-C1 ya digerido con Xbal y Sall por encima de 4361 pb que confirma que es del tamaño deseado. En los carriles 4 y 5 de la figura 9 se corrió el DNA del canal GIRK4 digerido con las mismas enzimas que el vector y se muestra la banda de 1259 pb que es el tamaño del fragmento esperado. Se purificaron tanto el vector digerido como el producto de la PCR y se prepararon para la ligación.

Después de la ligación del fragmento del canal obtenido por PCR al vector pEGFP-C1 se realizó la transformación en células competentes DH5 α . Se seleccionaron las colonias bacterianas positivas para crecerlas en medio LB y se hizo una minipreparación para obtener el DNA.

Se diseñó el mapa del vector pEGFP-C1/GIRK4 (figura 10) para lograr insertar la secuencia que codifica para el GIRK4.

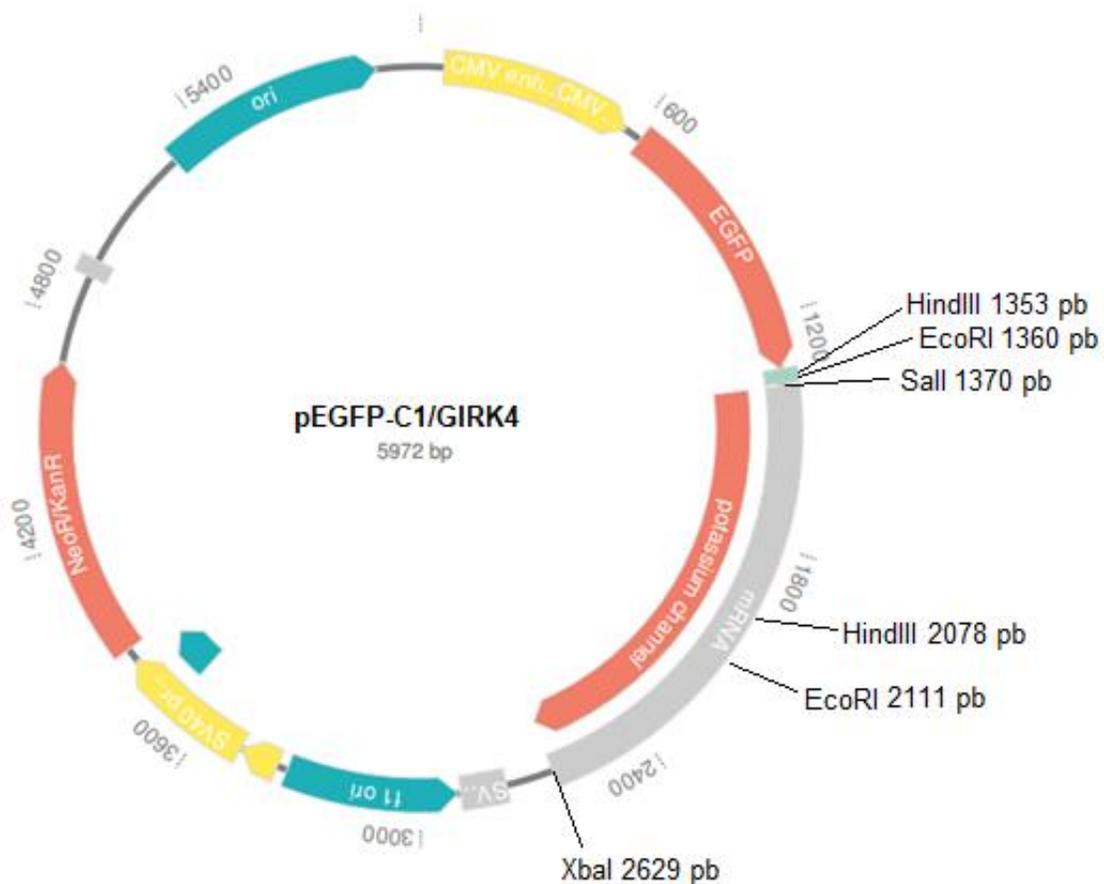


Figura 10. Mapa de la secuencia del canal GIRK4 en el vector pEGFP-C1. Se muestran algunos sitios de enzimas de restricción. Mapa hecho en GenScript®.

Ya que se logró la ligación del vector pEGFP-C1 con el fragmento subclonado de la secuencia del GIRK4, se hicieron digestiones enzimáticas (figura 11 y figura 12) para corroborar que el canal GIRK4 se unió en forma correcta al vector pEGFP-C1.

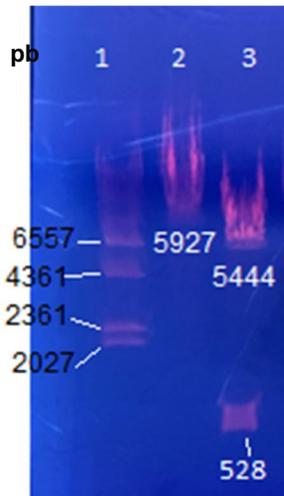


Figura 11. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran las digestiones enzimáticas del plásmido pEGFP-C1/GIRK4 con XbaI y Sall (carril 2) y digerido con EcoRI (carril 3). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.

En el carril 2 de la figura 11 se observa una sola banda esto quiere decir que solo una enzima cortó y la otra no cortó de tal manera que solo se abrió el DNA como en la figura 12. En cambio, en el carril 3 de la figura 11 se observan 2 bandas cuyos pesos corresponden a los esperados para la digestión con EcoRI. Esta enzima corta una vez dentro de la secuencia del canal e igualmente corta una vez dentro de la secuencia del vector. Con esto comprobamos que la secuencia del canal GIRK4 fue introducida dentro del vector pEGFP-C1 y el tamaño de los fragmentos obtenidos nos permite comprobar que el canal se insertó en el sentido correcto.

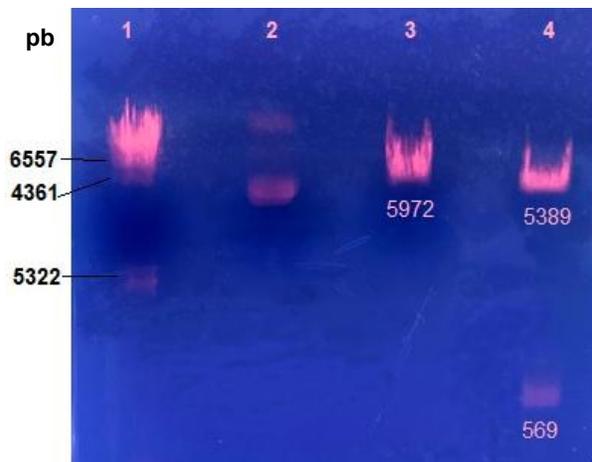


Figura 12. Separación por electroforesis en gel de agarosa en el que se muestran los resultados de las digestiones enzimáticas del plásmido pEGFP-C1/GIRK4 con XbaI (carril 2), digerido con Sall (carril 3) y con HindIII (carril 4). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 como referencia de los pesos.

En el carril 2 de la figura 12 se observa que la enzima XbaI no corta la secuencia de DNA, lo cual nos llevó a pensar que el sitio de unión del vector con el canal se pudo metilar al ser insertado en las bacterias. Como se mencionó el DNA del vector pEGFP-C1 se obtuvo de bacterias Dam⁻. La metilasa Dam es una enzima propia de *E. coli* que metila el DNA en la posición N⁶ de todas las adeninas en la secuencia GATC [Nelson & Cox, 2009] por lo que al utilizar la cepa DH5 α Dam⁻ no tienen esa metilasa y permite que se pueda cortar con la enzima XbaI. Es importante mencionar que el sitio de corte para la enzima XbaI es TCTAGA, por lo tanto, si al diseñar el plásmido pEGFP-C1/GIRK4 aparece GA antes o TC después del sitio de corte para XbaI, Dam metilaría el sitio impidiendo el corte. Esto es lo que sucede al insertar el nuevo plásmido en la cepa DH5 α donde la metilasa Dam no fue eliminada. En resumen, al ligar el canal con el vector se perdió el sitio de XbaI. En el carril 3 de la figura 12, el DNA fue digerido con Sall, se observa una banda que corresponde al DNA linearizado, lo que indica que esta enzima sí cortó. En carril 4 de la figura 12 se observan las dos bandas esperadas para el corte con HindIII, una banda de 569 pb y otra banda de 5389 pb.

De estas digestiones enzimáticas se corrobora que se logró la ligación del canal GIRK4 al vector pEGFP-C1 por medio de las enzimas Sall y XbaI.

11.3 Secuenciación.

Para confirmar los resultados de las digestiones enzimáticas, se mandó a secuenciar el DNA del canal (Instituto de Biotecnología, UNAM) con el primer GFP carboxil forward (BD bioscience, Clontech, CA) que permite leer a partir de la secuencia final que codifica para la EGFP y el inicio del marco de lectura del canal GIRK4. Se utilizó para corroborar que el final de la secuencia de la proteína verde y el principio de la secuencia del canal GIRK4 se encontraran en el marco de lectura correcto para su traducción posterior.

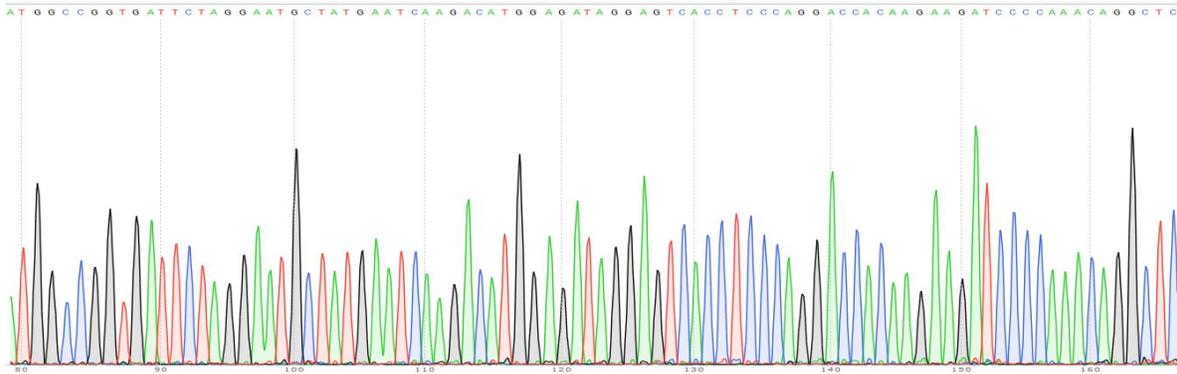


Figura 13. Electroferograma representativo de la secuencia del canal GIRK4.

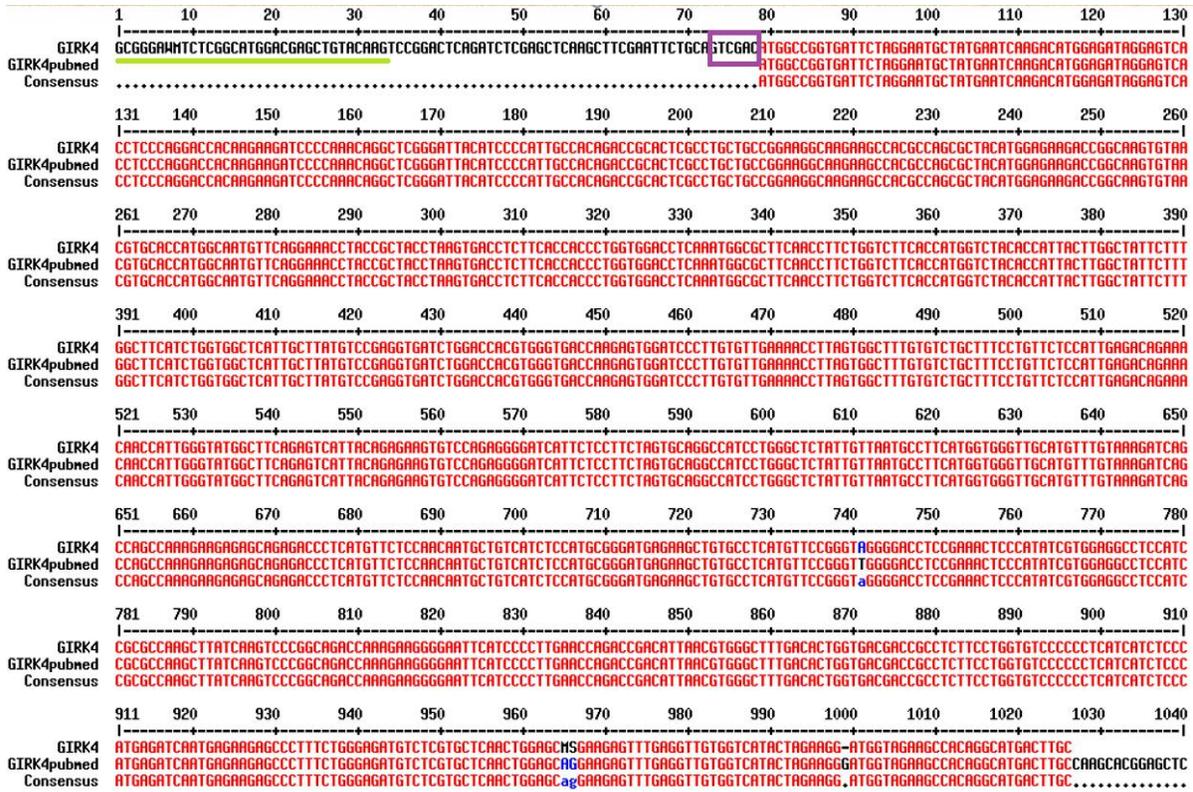


Figura 14. Alineamiento de los resultados de la secuenciación con el reportado en Krapivinsky et al. 1995 para GIRK4. GIRK4 es la secuencia que se mandó al IBT y GIRK4pubmed es la reportada en Genbank (L35771). Se muestra la secuencia de Sall (cuadrado morado) y la última parte de la secuencia que codifica para la proteína GFP (subrayado en verde).

Al comparar las secuencias (Figura 13 y 14), se observa que hay 100% de concordancia. Este tipo de secuenciación permite leer hasta 700 pb de forma confiable, lo que nos permite determinar que la secuencia del canal de potasio GIRK4 se encuentra dentro de la secuencia del plásmido pEGFP-C1. Se realizó una midipreparación para obtener mayor cantidad de DNA para los experimentos siguientes.

11.4 Fluorescencia de las células HEK293T transfectadas con el DNA de GFP y con GFP-GIRK4.

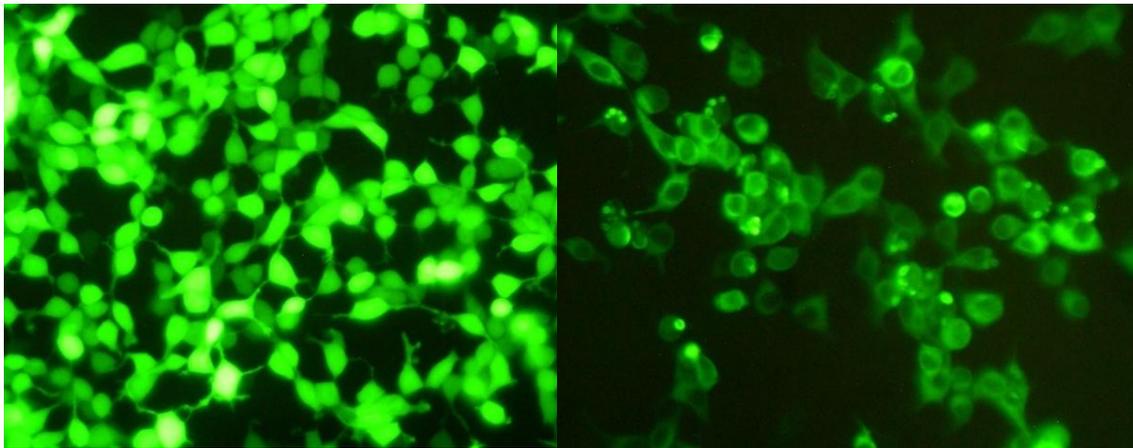


Figura 15. A la izquierda-Células HEK293T transfectadas con el DNA pEGFP C-1. A la derecha-Células HEK293T transfectadas con el DNA pEGFP C-1/GIRK4. Amplificación de 40x.

En la figura 15 a la izquierda, la fluorescencia se ve en toda la célula, ya que la proteína verde es citosólica mientras que en la figura 15 a la derecha se puede apreciar que algunas células HEK293T se transfectaron con el plásmido pEGFP-C1/GIRK4 y que se expresó la proteína verde fluorescente, se observa mayor fluorescencia en la parte externa de la célula, porque la proteína verde se tradujo seguido del canal GIRK4, que es una proteína transmembranal. También, se aprecian pequeñas partes internas fluorescentes, por lo que se puede proponer que el canal viaja en vesículas hacia la membrana plasmática.

11.5 Comparación de la especificidad de los anticuerpos JL-8 monoclonal y del GIRK4 policlonal.

Se realizaron dos ensayos de Western Blot para identificar cuál de los dos anticuerpos sería el indicado para la inmunoprecipitación, el policlonal para GIRK4 o el monoclonal JL-8 para EGFP.

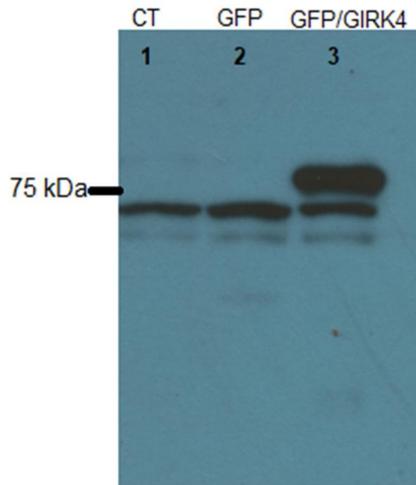


Figura 16. Inmunoblot con el anticuerpo policlonal para GIRK4 del lisado de las células HEK293T sin transfectar como control (carril 1), el lisado de las células HEK293T transfectadas con el vector pEGFP-C1 (carril 2) y el lisado de las células HEK293T transfectadas con el plásmido pEGFP-C1/GIRK4.

En el primer carril del inmunoblot de la figura 16 se aprecian dos fragmentos por debajo de 75 kDa. Esto mismo se observa en el segundo carril de la figura 16. Estos fragmentos no se esperaban, pero al revisar el manual del anticuerpo, se puede determinar que se tratan de otras proteínas que fueron detectadas por el anticuerpo, sin embargo, se desconoce su identidad. En cuanto al tercer carril de la figura 16, se observan claramente 3 fragmentos, dos parecidos a los de los otros carriles y, además, un fragmento que está ligeramente arriba de los 75 kDa, es consistente con el peso esperado de la proteína del canal GIRK4 (47.7 kDa) unida con la proteína verde fluorescente (~27 kDa).

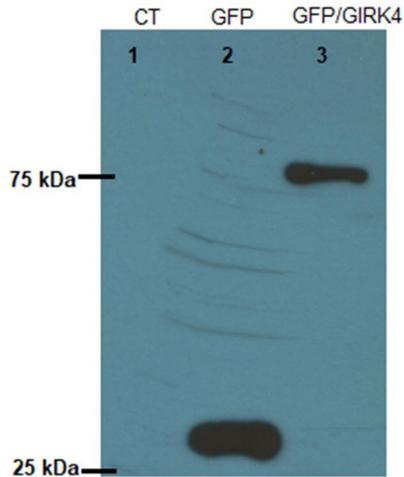


Figura 17. Inmunoblot con el anticuerpo monoclonal para EGFP del lisado de las células HEK293T sin transfectar como control (carril 1), el lisado de las células HEK293T transfectadas con el vector pEGFP-C1 (carril 2) y el lisado de las células HEK293T transfectadas con el plásmido pEGFP-C1/GIRK4 (carril 3).

En el primer carril de la figura 17 migraron las proteínas de células HEK293T no transfectadas, no se revela algún fragmento, ya que no se encontraba la proteína EGFP. En el segundo carril de la figura 17 aparece una banda por encima de los 25 kDa, la banda esperada tiene un peso aproximado de 27 kDa que corresponde a la proteína EGFP. Por último, en el tercer carril de la figura 17 se muestra una banda a los 75 kDa que concuerda con la esperada (74 kDa).

Al comparar las placas de las figuras 16 y 17 los fragmentos se aprecian de mejor manera en la figura 17 que se revelaron con el anticuerpo monoclonal EGFP, ya que no se muestran otras bandas de reconocimiento. Por esta razón se decidió proseguir la inmunoprecipitación para el ensayo proteómico con la proteína G acoplado con el anticuerpo monoclonal JL-8.

11.6 Inmunoprecipitación con el anticuerpo JL-8 y las perlas con proteína G.

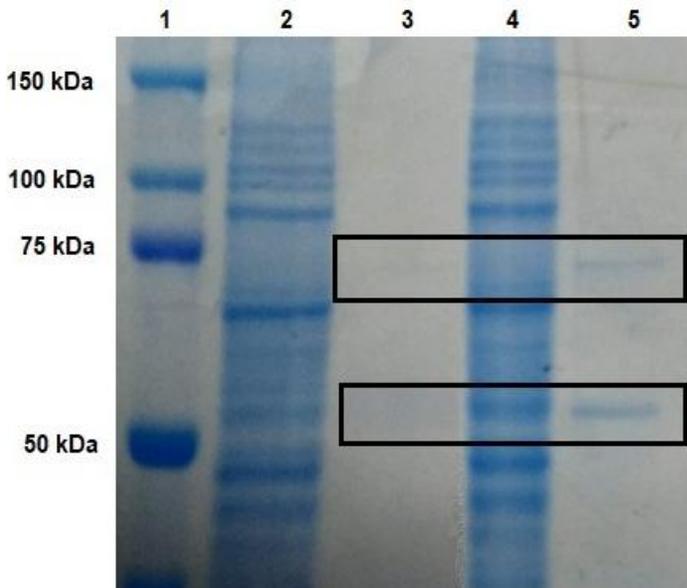


Figura 18. Separación por electroforesis en un gel de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Se corrieron los inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal para EGFP de la muestra control negativo sobrenadante del inmoprecipitado (carril 2) y su inmunoprecipitado (carril 3), y la proteína EGFP-GIRK4 sobrenadante (carril 4) y su inmunoprecipitado (carril 5). El marcador se observa en el carril 1 como referencia de los pesos.

Los carriles 2 y 4 de la figura 18 se corrieron los sobrenadantes de las muestras donde se encuentran todas las proteínas que no formaron el complejo antígeno-anticuerpo. En cambio, en los carriles 3 y 5 de la figura 18, se encuentran las proteínas que se acoplaron al anticuerpo JL-8, en este caso la proteína EGFP. En el 3 carril no se observa ningún fragmento, por lo que ninguna proteína se unió al anticuerpo. En el carril 5 de la figura 18 se observa una banda por debajo de 75 kDa que se trata de la proteína EGFP-GIRK4 (~75 kDa) y otra banda por arriba de 50 kDa, se propone que se trate de la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG) ya que al desnaturalizar la muestra, se rompe la unión del anticuerpo con la proteína y al ser muy abundante la IgG igualmente aparece en el gel al ser teñido, sin embargo no representa una interferencia ya que la banda esperada de la proteína se observa definida en ~75 kDa.

Ya que solamente se aprecian los dos fragmentos en el carril 5 de la figura 18, el anticuerpo monoclonal JL-8 no tiene inespecificidades y se pueden aislar la proteína EGFP exclusivamente sin el riesgo de que también se acompleje con otras proteínas que interfieran con el estudio proteómico.

11.7 Análisis proteómico

Con los resultados del análisis proteómico de la proteómica del gel de poliacrilamida, se identificaron un total de 632 proteínas y se realizó el análisis de los datos con lo cual se seleccionaron 14 proteínas de posible interés.

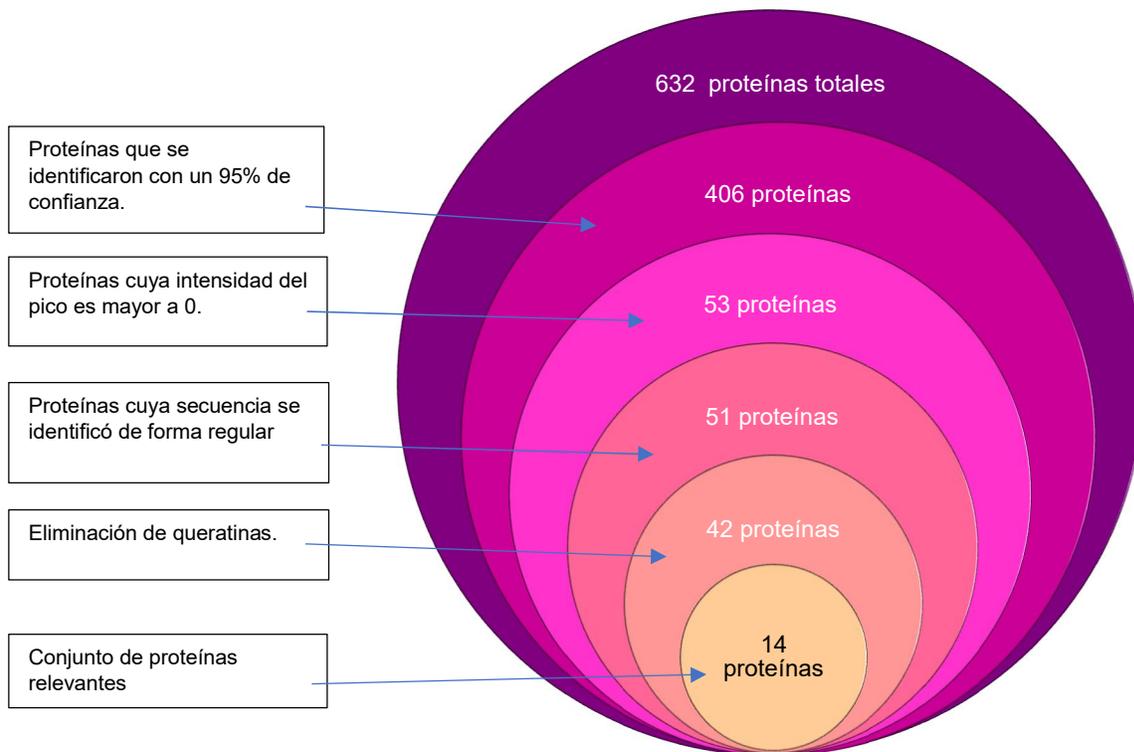


Figura 19. Diagrama de Venn de los filtros empleados en el análisis de los resultados obtenidos del ensayo proteómico.

En la figura 19 se explican los criterios que se utilizaron para la selección de las proteínas de interés. En el primer filtro se eliminaron aquellas que se identificaron con menos de 95% de confianza, con lo que se redujeron las 632 proteínas a 406. En el segundo filtro se eliminaron las proteínas que mostraran una intensidad de pico igual a 0, esto es porque a diferencia de otras proteínas identificadas, éstas tenían una concentración tan baja que se vuelve insignificante para el análisis, con bajo este criterio se redujeron de 406 proteínas a 53. En el tercer filtro se eliminaron aquellas cuya secuencia fue reconocida de manera

reversa por el software. En el cuarto filtro, se eliminaron todas las queratinas, que son proteínas que se consideran como contaminantes de la muestra, reduciendo las proteínas a 42 y por último, se realizó un análisis en STRING donde se observaron las interacciones de las 42 proteínas y se escogieron 14 proteínas ya que presentan interacciones con el canal de potasio GIRK4 y con las demás de la misma red de proteínas. A las 14 proteínas, se le denominará el conjunto de proteínas relevantes. La red de interacciones de las proteínas encontradas se muestra en la figura 19, así como la descripción de cada proteína en la tabla 3.

Tabla 3. Nombre, descripción y código de UniProtKB de las proteínas identificadas en el análisis proteómico y seleccionadas por su posible relevancia.

Gen	Nombre de la proteína	Código UniProtKB
TUBA1C	Tubulina, alfa 1c;(449 aa)	Q9BQE3
HSP90AB1	Proteína de choque térmico 90kDa alfa (citosólica), clase B miembro 1; (724 aa)	P08238
EEF1A1	Factor 1 de elongación en la traducción eucariótica (462 aa)	P68104
KCNJ5	Canal de potasio rectificador entrante, subfamilia J, miembro 5. (419 aa)	P48544
TUBB4B	Tubulina, beta 4B clase IVb. (445 aa)	P68371
AKAP9	Proteína de andamiaje de la cinasa PRKA 9; (3907 aa)	Q99996
HNRNPH1	Ribonucleoproteína heterogénea H1 (H); (449 aa)	P31943
PCBP2	Proteína de unión poli(rC) 2; (366 aa)	Q15366
HSPA1A	Proteína de choque térmico 70kDa 1A. (641 aa)	P0DMV8
CCT4	Chaperona TCP1, subunidad 4 (delta). (539 aa)	P50991
GNB2L1	Proteína de unión a guanina. (317 aa)	P63244
HSPA8	Proteína de choque térmico 70 kDa. (646 aa)	P11142
GABBR1	Subunidad 1 del receptor tipo B del ácido γ -aminobutírico (961 aa)	Q9UBS5
NUMA1	Proteína del aparato nuclear mitótico. (2115 aa)	Q14980

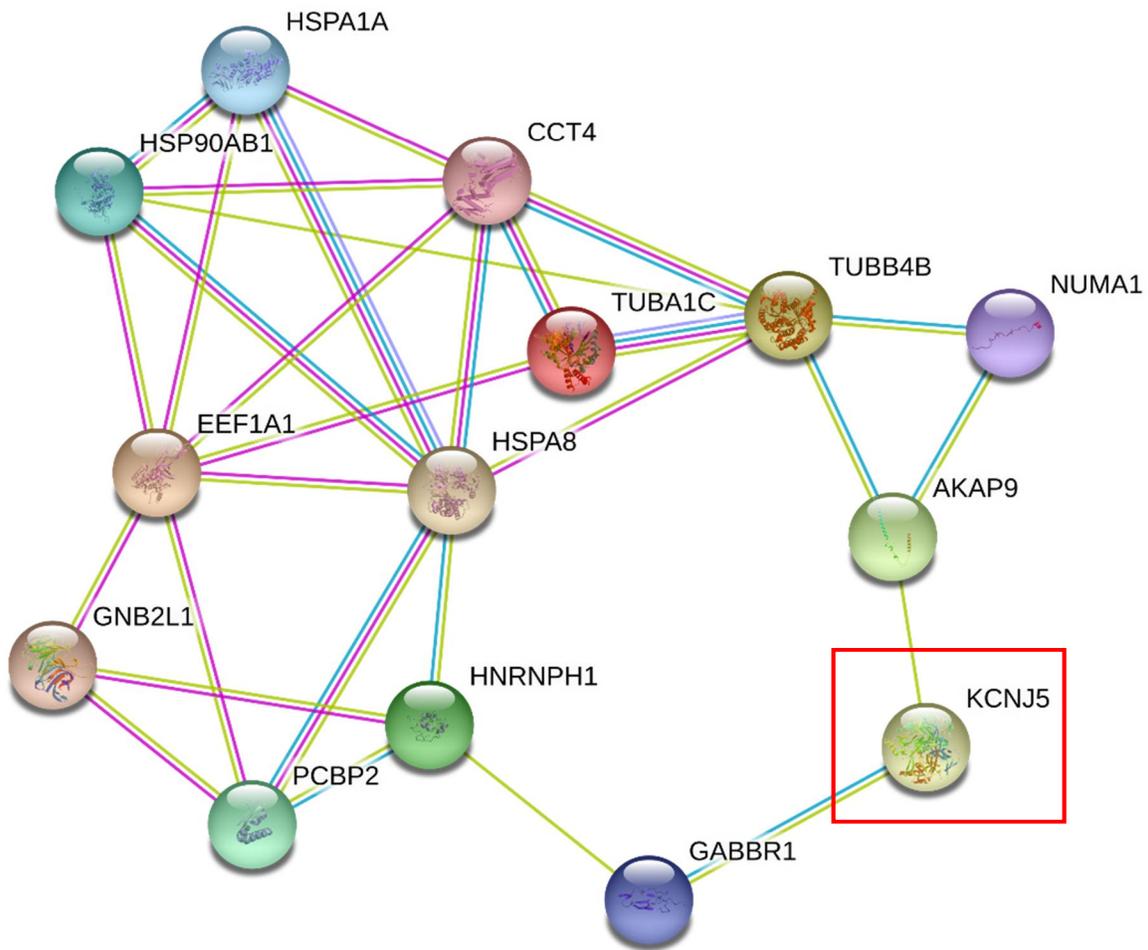


Figura 20. Red de interacciones del conjunto de proteínas relevantes. Los colores de las proteínas son los que el programa otorgó según la cantidad de interacciones que tienen con otras. Aquellas donde se observa una estructura en su interior, significa que ya se conoce o se predice cómo es su estructura tridimensional. Las líneas que vinculan a las proteínas son: verde – se mencionan ambas proteínas en un mismo texto, azul- en bases de datos actualizadas, rosa- determinados con soporte experimental y gris- se tratan de proteínas homólogas entre ellas mismas. KCNJ5 (la esfera señalada en el cuadro rojo) es el gen que codifica para el canal GIRK4.

En el programa PANTHER GO-Slim se analizaron las proteínas relevantes y se clasificaron de acuerdo a las diferentes funciones como “Función molecular” (figura 20), “Procesos biológicos” (figura 21), “Clase de proteína” (figura 22) y “Vía de señalización” (figura 23). La información se muestra en los diagramas de pastel de las figuras 20 a la 23 con una breve explicación de que genes abarcan un mayor porcentaje en cada clasificación, así como su respectivo código en *Gene Ontology*.

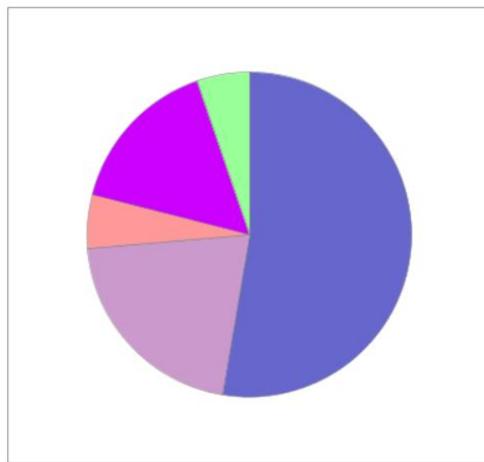


Figura 21. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento de acuerdo a sus funciones moleculares del conjunto de proteínas relevantes. Se agrupan en las categorías: unión (■), actividad catalítica (■), actividad molecular traductora (■), actividad estructural molecular (■) y actividad transportadora (■).

En la figura 21 el mayor porcentaje lo tienen las proteínas de unión (GO:0005488) como las tubulinas y las proteínas de choque térmico; en segundo lugar, están aquellas con actividad catalítica (GO:0003824), que igualmente son las proteínas de choque térmico.

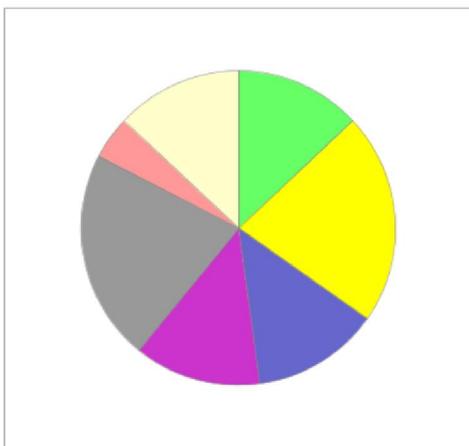


Figura 22. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por sus procesos biológicos del conjunto de proteínas relevantes. Se agrupan en las categorías: regulación biológica (■), biogénesis (■), proceso celular (■), localización (■), proceso metabólico (■), proceso multicelular del organismo (■) y respuesta al estímulo (■).

En la figura 22 las categorías biogénesis (GO:0071840) y proceso metabólico (GO:0008152) ocupan el mismo porcentaje, en biogénesis se encuentran las tubulinas, GNB2L1 y HSPA8, mientras que aquellas que están involucradas en algún proceso metabólico (GO:0008152) son HNRNPH1, RACK1, HSPA8, PCBP2.



Figura 23. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por clase de proteínas del conjunto de proteínas relevantes. Se agruparon en las siguientes categorías: chaperona (■), proteína del citoesqueleto (■), modulador enzimático (■), hidrolasa (■), de unión de ácidos nucleicos (■) y receptora (■).

En la figura 23 la categoría con mayor porcentaje es la de las proteínas de unión de ácidos nucleicos (PC00171) donde se incluyen EEF1A1, PCBP2 y HNRNPH1; le siguen las hidrolasas (PC00121) y los moduladores enzimáticos (PC00095) como EEF1A1 y PCBP2.

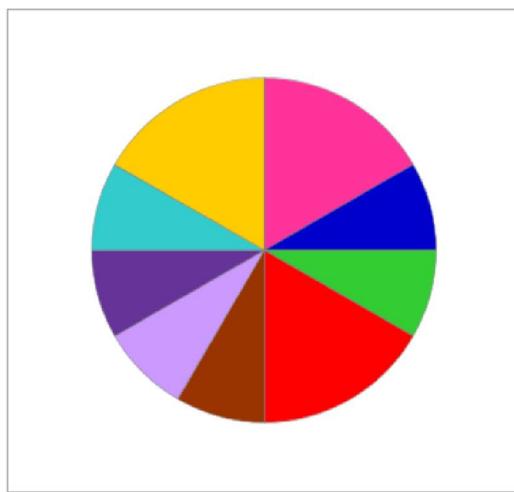


Figura 24. Diagrama de pastel hecho en PANTHER GO-Slim donde se muestra el agrupamiento por vías de señalización del conjunto de proteínas relevantes y se agrupan en las siguientes categorías: vía de señalización de apoptosis (■), regulación del citoesqueleto por medio de Rho GTPasa (■), señalización del receptor II GABA (■), vía de señalización de la hormona liberadora de gonadotropina (■), vía de señalización de la proteína G-vía de Gi/Gs (■), vía de señalización de la proteína G-vía de Gi/Go (■), enfermedad de Huntington (■), vía de señalización del receptor 2 y 4 muscarínico acetilcolina (■) y enfermedad de Parkinson (■).

En la figura 24 se tiene registrado que dos de las proteínas HSPA1A y HSPA8 están involucradas en la vía de señalización de apoptosis (P00006) y en la enfermedad de Parkinson (P00049). En cuanto a la vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (P06664), dos proteínas están involucradas: HSPA1A y TUBA1C.

11.8 Proteínas reportadas que interactúan con el canal GIRK4.

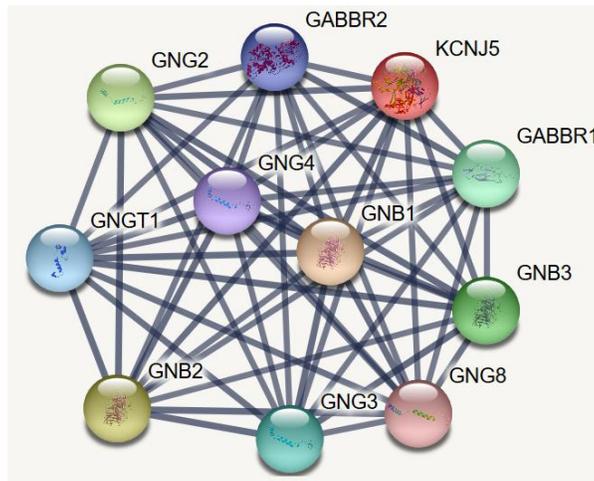


Figura 25. Red de interacciones de las proteínas que interactúan con el canal GIRK4 (en rojo) obtenido del programa STRING. Los colores de las proteínas son los que el programa otorgó de manera arbitraria. Aquellas donde se observa una estructura en su interior, significa que ya se conoce o se predice cómo es su estructura tridimensional.

En la figura 25 se describen las proteínas reportadas que tienen interacción con el canal como GABBR1 y GABBR2 las cuales forman el receptor a GABA y las GNB1, GNB2, GNB3, GNG2, GNG3, GNG4, GNG8 y GNGT1 que codifican a diferentes subunidades de la proteína de unión a guanina (proteína G).

(Figura disponible en: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=5pdWRvCP8nQ7>)

11.9 Descripción de las proteínas de posible interés.

Como se observa en la figura 19, los vínculos directos con el GIRK4 son con las proteínas codificadas por el gen AKAP9 y GABBR1.

GABBR1

El gen codifica para un componente de un dímero de un receptor para GABA acoplado a la proteína G, el cuál es el principal neurotransmisor inhibidor de la actividad del sistema nervioso central en mamíferos. Se ha encontrado que el déficit de esta proteína en varias partes del cerebro está asociado al autismo, desorden bipolar y esquizofrenia [Fatemi *et al.*, 2011]

En los diagramas de pastel (figura 21; figura 23; figura 24), se le asigna la función de unión, se le clasifica como una proteína receptora y presenta actividad como receptor acoplado a la proteína G. Se encuentra en la membrana como un componente integral y forma un complejo receptor.

Relación con el GIRK4.

Se sabe que para que el canal de potasio se active, se necesita que el dímero $G\beta\gamma$ se acople al canal. Para que se forme el dímero, es necesario que un estímulo llegue a través de este receptor para activar a la proteína G. [Yudin *et al.*, 2018]. Por consiguiente, es congruente que el canal GIRK4 este acoplado al receptor de GABA, GABBR1.

AKAP9

Este gen codifica para la proteína de anclaje A-cinasa 9 o Yotiao que apila varias cinasas y fosfatasas en el centrosoma y en el aparato de Golgi. Se requiere para mantener la integridad del aparato de Golgi. Pertenece a la familia de AKAPs que tienen tres características en común: se unen a la subunidad reguladora de PKA a través del dominio de andamiaje, son sitios de anclaje para otras proteínas

de señalización como las cinasas, fosfatasas entre otros y son el único dominio que acomoda los complejos de señalización en la célula [Pidoux & Taskén, 2016].

El programa PANTHER no arrojó información de este gen, así que no se encuentra clasificada en ningún diagrama anterior (figuras 21-24).

Relación con el GIRK4.

Las proteínas GIRK4 y AKAP9 se han visto involucradas en el Síndrome QT Largo [de Villiers *et al.*, 2014]. En estudios relacionados con el síndrome se encontró que el GIRK4 no llega a la membrana, debido a la mutación Gly387Arg y en el caso del AKAP9, la mutación Ser1570Leu que modifica la interacción de la proteína yotiao con el canal KCNQ1, un canal de potasio, y además reduce la fosforilación dependiente de PKA del canal KCNQ1 [Chen *et al.*, 2007; Garcia-Elias & Begoña, 2018].

Sería de gran interés encontrar la relación directa de estas proteínas mediante ensayos funcionales y determinar la relación que pudieran tener sobre todo en el Síndrome QT largo o quizás en otra enfermedad relacionada con alteraciones en la función del GIRK4 como el hiperaldosteronismo.

CCT4

El gen CCT4 codifica para la subunidad delta del complejo T que contiene chaperonas o TRiC. Es una molécula chaperona que asiste en el plegamiento de algunas proteínas como tubulinas [Frydman *et al.*, 1992] y la β -actina [Gao *et al.*, 1992]. Se localiza en el citoplasma y en el nucleoplasma de la mayoría de las células humanas, además se ha encontrado que juega un papel importante en la formación de los microtúbulos. Se cree que influye en el plegamiento de la actina y la tubulina. Tiene una actividad protectora ya que inhibe la acumulación de poliglutamina lo que reduce el plegamiento incorrecto de proteínas en condiciones patológicas como sucede en la enfermedad de Huntington [Tam *et al.*, 2006]

Forma parte del complejo Síndrome de Bardet-Biedl (BBS)/CCT y podría participar en el ensamblaje de BBSome, que es un complejo involucrado en la regulación de la ciliogénesis que transporta vesículas a los cilios [Seo *et al.*, 2010].

El programa PANTHER no arrojó información de este gen así que no se encuentra incluida en las figuras 21 a la 24.

Relación con el GIRK4.

Ya que se identificó en el análisis proteómico, se sugiere que esta proteína está involucrada en el plegamiento de la proteína GIRK4; sin embargo, no se tienen conocimientos para confirmar esta propuesta.

Tubulinas TUBB4B y TUBA1C.

Las tubulinas son proteínas que constituyen a los microtúbulos. Están presentes en el citoesqueleto en la mayoría de las células del ser humano y otras células no germinales. Las tubulinas tienen una función de unión de GTP y muestran actividad molecular estructural.

Relación con el GIRK4.

Es probable que estas proteínas estén involucradas en el tráfico a la membrana plasmática del canal de potasio GIRK4. Esta proteína y otras proteínas de membrana se mueven gracias a su asociación al citoesqueleto y a las kinesinas que viajan a través de los microtúbulos [Cooper, 2000].

Choque térmico HSPA1A, HSPA8 y HSP90AB1.

HspA1A pertenece a la familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70s) que son chaperonas para mantener la homeostasis celular. Las HspA1A se localizan en la membrana plasmática y se unen a lípidos específicos para durante procesos fisiológicos como la apoptosis.

La HSPA8 pertenece a la familia Hsp70, se encuentra en la mayoría de los tejidos y se localiza en el núcleo y en el citosol de la célula. Esta proteína desempeña funciones como la regulación de la translocación de proteínas y la secreción de insulina estimulada por glucosa. Se ha visto involucrado en varias enfermedades como cáncer, cardiovasculares, hepáticos y neurológicos [Boswell *et al.*, 2014].

Relación con el GIRK4.

En el estudio de McCallister *et al.*, (2016), se descubrió que altas concentraciones de K⁺ provocaron la unión de HSPA1A a los lípidos aniónicos presentes en la membrana plasmática.

11.10 Discusión general

En la actualidad son más comunes los estudios proteómicos para tener un panorama más extenso de las proteínas involucradas en enfermedades complejas que prevalecen hoy en día. Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado el análisis proteómico de la familia de canales GIRK y las únicas proteínas que se conoce que tienen interacción con el canal son las proteínas G y los receptores acoplados a la proteína G.

Cabe destacar que el ensayo proteómico se hizo en la línea celular HEK293T, que es de riñón embrionario, en la cual la cantidad de transcritos de GIRK4 presente en la célula es de 0.1 TPM y en tejidos de túbulo renales, la expresión de la proteína es media, esto se refiere a la intensidad de la tinción de biopsias del tejido al ser tratadas con un anticuerpo específico para la proteína. (Las biopsias fueron tomadas por el Departamento de Patología del Hospital Uppsala Akademiska en Uppsala, Suecia para fines de diagnóstico. Para observar las tinciones, los datos y las imágenes están disponibles en: Human Protein Atlas v18.1 <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120457-KCNJ5/tissue/kidney>). Sin embargo, se obtuvieron resultados que podrían ser de gran relevancia al

determinar cómo es la interacción del canal con otras proteínas como AKAP9 y CCT4, así como la cascada de señalización donde están involucradas que podría ser la clave para entender mejor a las enfermedades y posiblemente desarrollar nuevos fármacos para su tratamiento.

Es importante estudiar diferentes estados del proteoma en los cuales participe este canal en las células del cuerpo humano. Se sugiere el estudio proteómico en tejidos donde la presencia de la proteína sea mayor como tejidos cardiacos, de cerebro y de las glándulas suprarrenales. Por ejemplo, en el artículo de Currie y Delles, (2016) se menciona la importancia del desarrollo de estudios “omicos”, entre ellos la proteómica, para estudiar la hipertensión, así como Pena *et al.*, (2015) quienes reportan ensayos proteómicos de plasma de pacientes con hipertensión o diabetes tipo 2, asociados a un mayor riesgo de padecer enfermedades renales, reflejado en la micro y macroalbuminuria. Otro ejemplo, reportado en Shimada *et al.*, (2017) que, en los pacientes con altos niveles de glucosa en sangre, se encontró la expresión de la aldosterona sintasa y la segregación excesiva de aldosterona lo que conduce a hipertensión.

12. Conclusiones

En este trabajo se identificaron 14 proteínas con una interacción potencial en el modelo celular HEK293T, de las cuales dos proteínas tienen una interacción directa mostrada en bases de datos con el canal GIRK4 y doce proteínas que se encontraron asociadas por la inmunoprecipitación pero que su interacción con el canal aún no ha sido reportada por lo que se propone es de forma indirecta.

Se plantea que la proteína de andamiaje AKAP9 y la subunidad delta del complejo TRiC son posibles interactores directos del canal GIRK4; esta interacción requiere de evidencia adicional para confirmarse y, sobre todo, para aportar elementos que conduzcan al planteamiento de un papel fisiológico o patológico para dicha interacción.

13. Perspectivas

- Es necesario repetir el análisis proteómico para determinar si se obtienen los mismos resultados, ya que se trata de un análisis dinámico que depende de muchas variables.
- Se plantea realizar ensayos en tejidos como del nodo auricular, nervioso y de las glándulas suprarrenales donde se reporta una mayor expresión del GIRK4 o en la línea celular HBEC3-KT que es de pulmón donde la expresión del transcrito, medida por RNA secuencial es muy alta (9.5 TPM), para determinar qué proteínas aparecen en el proteoma y analizar las posibles interacciones con el canal.

En cuanto a los resultados obtenidos, habrá que diseñar los experimentos que permitan demostrar si existe una relación del canal con las proteínas AKAP9 y CCT4 y, posteriormente, con las tubulinas y las proteínas de choque térmico encontradas.

- Se propone hacer un inmunoblot con el anticuerpo específico para AKAP9 o el anticuerpo específico para CCT4 y confirmar la presencia de estas proteínas.
- Transfectar RNA de interferencia del AKAP9 o CCT4, además del plásmido pEGFP-C1/GIRK4, en células HEK293T para modificar su expresión y determinar si la expresión del GIRK4 modifica su localización (por fluorescencia).

14. Bibliografía

Aidley, D. & Stanfield, P. R. (1996). *Ion Channels: Molecules in Action*. Cambridge University Press. pp 72-77.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2016). *Biología molecular de la célula*. OMEGA. Sexta edición en español. España. pp 613-614 y 1276.

Biggin, P. C., Roosild, T., & Choe, S. (2000). Potassium channel structure: Domain by domain. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(4), 456-461.

Bichet, D., Haass, F. A., & Jan, L. Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 957-967.

Bolsover, S., Hyams, J., Shephard, E., White, H., & Wiedemann, C. (2004). *Cell Biology: A Short Course Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Bond, C. T., Pessia, M., Xia, X. M., Lagrutta, A., Kavanaugh, M. P. & Adelman, J. P. (1994). Cloning and expressions of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels*, 2, 183-191.

Boswell-Casteel, R. C., Johnson, J. M., Duggan, K. D., Tsutsui, Y., & Hays, F. A. (2015). Overproduction and biophysical characterization of human HSP70 proteins. *Protein Expression and Purification*, 106, 57-65.

Can, T. (2014). Introduction to bioinformatics. *Methods in Molecular Biology* 1107:51-71.

Chen, L., Marquardt, M. L., Tester, D. J., Sampson, K. J., Ackerman, M. J., & Kass, R. S. (2007). Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20990–20995.

Choi, M., Scholl, U. I., Yue, P., Bjorklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C. J., Lolis, E., Wisgerhof, M. V., Geller, D. S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerström, G., Wang, W., Carling, T., & Lifton, R. P. (2011). K Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension. *Science*, 331(6018), 768-772.

Corzo J. Transporte a través de membranas. 1. Poros y canales. Universidad de La Laguna, España. Disponible en: www.biorom.uma.es/contenido/JCorzo/temascompletos/transporte/Clase%201.htm Consultado el 31 de enero de 2019.

Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2da edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Microtubule Motors and Movements. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9833/>

Currie, G. & **Delles**, C. (2017). Review. The Future of “Omics” in Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 33, 601-610.

Dhar, M. S., & **Plummer**, H. K. (2006). Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiology*, 6(1), 8.

Doyle, D. A., Morais Cabrial, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., & Cohen, S. L. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.

Fatemi, S. H., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2011). Deficits in GABAB receptor system in schizophrenia and mood disorders: A postmortem study. *Schizophrenia Research*, 128(1-3), 37-43.

Fromm, J., & **Lautner**, S. (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell & Environment*, 30(3), 249-257.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J. S., Tempst, P., & Hartl, F. U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex

containing TCP-1 and structurally related subunits. *The EMBO journal*, 11(13), 4767–4778.

Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. H., & Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell*, 69, 1043–1050.

Garcia-Elias, A., & **Benito**, B. (2018). Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 692.

Glaaser, I. W., & **Slesinger**, P. A. (2015). Structural Insights into GIRK Channel Function. *International Review of Neurobiology Structure to Function of G Protein-Gated Inwardly Rectifying (GIRK) Channels*, 117-160.

Gong, Q., Weide, M., Huntsman, C., Xu, Z., Jan, L. Y., & Ma, D. (2007). Identification and Characterization of a New Class of Trafficking Motifs for Controlling Clathrin-independent Internalization and Recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 13087-13097.

Hagiwara, S., & **Takahashi**, K. (1974). The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *The Journal of Membrane Biology*, 18(1), 61-80.

Hagiwara, S., Miyazaki S., & Rosenthal N. P. (1976). Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *The Journal of General Physiology*, 67(6), 621-638.

Hardege, I., Long, L., Al Maskari, R., Figg, N., & O'Shaughnessy, K. M. (2018). Targeted disruption of the *Kcnj5* gene in the female mouse lowers aldosterone levels. *Clinical science (London, England : 1979)*, 132(1), 145–156.

Hedin, K. E., Lim, N. F. & Clapham, D. E. (1996). Cloning of a *Xenopus laevis* Inwardly Rectifying K Channel Subunit That Permits GIRK1 Expression of IKACH Currents in Oocytes. *Neuron*, 16(2), 423-429.

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 90(1), 291-366.

Hille, B. (2001). Ionic Channels of Excitable Membranes. Tercera edición. USA. Sinauer Associates. pp 314.

Hood, L., Flores, M. A., Brogaard, K. R., & Price, N. D. (2013). Chapter 23— Systems Medicine and the Emergence of Proactive P4 Medicine: Predictive, Preventive, Personalized and Participatory. Handbook of Systems Biology. 445-467.

Huang, X., & **Jan**, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of Cell Biology*, 206(2), 151-162.

Keerthikumar, S., & **Mathivanan**, S. (2017). An Introduction to Proteome Bioinformatics. *Methods in Molecular Biology Proteome Bioinformatics*, 1549, 1-3.

Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T., & Kumanishi, T. (1999). Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K channels. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1091-1097.

Kobayashi, T., Washiyama, K., & Ikeda, K. (2004). Inhibition of G Protein-Activated Inwardly Rectifying K Channels by Various Antidepressant Drugs. *Neuropsychopharmacology*, 29(10), 1841-1851.

Krapivinsky, G., Medina, I., Eng, L., Krapivinsky, L., Yang, Y., & Clapham, D. E. (1998). A Novel Inward Rectifier K Channel with Unique Pore Properties. *Neuron*, 20(5), 995-1005.

Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362(6416), 127-133.

Lesage, F., Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M., & Hugnot, J. (1994). Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K channels in the brain. *FEBS Letters*, 353(1), 37-42.

Levitan, I., & **Kaczmarek**, L. (2015). *The neuron: Cell and molecular biology* (Third ed.). New York: Oxford university press. pp 603.

Lu, Z., & **Mackinnon**, R. (1994). Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K channel. *Nature*, 371(6494), 243-246.

Mackinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters*, 555(1), 62-65.

Mccallister, C., Kdeiss, B., & Nikolaidis, N. (2015). Biochemical characterization of the interaction between HspA1A and phospholipids. *Cell Stress and Chaperones*, 21(1), 41-53.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249-257.

Nelson, D., & **Cox**, M. (2009). Lehninger Principios de Bioquímica. OMEGA. Quinta edición. España. pp 994 y 995.

O'Connor C & **Adams** J. (2010). Essentials of Cell Biology Cambridge, MA: NPG Education, Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997540> Revisado el 4 de abril de 2019.

Partiseti, M., Collura, V., Agnel, M., Culouscou, J., & Graham, D. (1998). Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Letters*, 434(1-2), 171-176.

Pena, M. J., Jankowski, J., Heinze, G., Kohl, M., Heinzl, A., Bakker, S. J., Gansevoort R. T., Rossing P., de Zeeuw D., Heerspink H. J., & Jankowski, V. (2015). Plasma proteomics classifiers improve risk prediction for renal disease in patients with hypertension or type 2 diabetes. *Journal of Hypertension*, 33(10), 2123-2132.

Pidoux, G., & Taskén, K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*, 44(5), 271-284.

Prada, E. T., Burrello, J., Reincke, M., & Williams, T. A. (2017). Old and New Concepts in the Molecular Pathogenesis of Primary Aldosteronism. *Hypertension*, 70(5), 875-881.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363.

Ruppersberg, J. (2000). Intracellular regulation of inward rectifier K channels. *Pflügers Archiv*, 441(1), 1-11.

Samways, D. S. (2014). Applications for Mass Spectrometry in the Study of Ion Channel Structure and Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, 237-261.

Seo, S., Baye, L. M., Schulz, N. P., Beck, J. S., Zhang, Q., Slusarski, D. C., & Sheffield, V. C. (2010). BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1488-1493.

Shah, T. R., & Misra, A. (2011). Proteomics. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, 387-427.

Shimada, H., Kogure, N., Noro, E., Kudo, M., Sugawara, K., Sato, I., Shimizu K., Kobayashi M., Suzuki D., Parvin R., Saito-Ito T., Uruno A., Saito-Hakoda A., Rainey W. E., Ito S., Yokoyama A., & Sugawara, A. (2017). High glucose stimulates expression of aldosterone synthase (CYP11B2) and secretion of aldosterone in human adrenal cells. *FEBS Open Bio*, 7(9), 1410-1421.

Sim, J. H., Yang, D. K., Kim, Y. C., Park, S. J., Kang, T. M., So, I., & Kim, K. W. (2002). ATP-sensitive K channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in

guinea pig gastric myocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(1).

Spauschus, A., Lentz, K., Wischmeyer, E., Dissmann, E., Karschin, C., & Karschin, A. (1996). A G-protein-activated inwardly rectifying K channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *The Journal of Neuroscience*, 16(3), 930-938.

Sugaya, N., Kobayashi, T., & Ikeda, K. (2013). Role of GIRK Channels in Addictive Substance Effects. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 2, 1-11.

Tam, S., Geller, R., Spiess, C., & Frydman, J. (2006). The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1155-1162.

Tanemoto, M., Fujita, A., Higashi, K., & Kurachi, Y. (2002). PSD-95 Mediates Formation of a Functional Homomeric Kir5.1 Channel in the Brain. *Neuron*, 34(3), 387-397.

Tang, W., Qin, C. L., & Yang, X. C. (1995). Cloning, localization and functional expression of a human brain inward rectifier potassium channel (hIRK1). *Receptors Channels*. 3, 175-183.

Tarasov, A., Dusonchet, J., & Ashcroft, F. (2004). Metabolic Regulation of the Pancreatic Beta-Cell ATP-Sensitive K Channel: A Pas de Deux. *Diabetes*, 53(Supplement 3).

de Villiers, C. P., van der Merwe, L., Crotti, L., Goosen, A., George, A. L., Jr, Schwartz, P. J., Brink, P. A., Moolman-Smook. J. C., & Corfield, V. A. (2014). AKAP9 is a genetic modifier of congenital long-QT syndrome type 1. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 7(5), 599–606.

Werner, P., Hussy, N., Buell, G., Jones, K. A., & North, R. A. (1996). D2, D3 y D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, 49(4), 656-661.

Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159-1204.

Yamada, M., Inanobe, A., & Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacology Review*, 50(4), 723-760.

Yang, Y., Yang, Y., Liang, B., Liu, J., Li, J., Grunnet, M., Olesen, S. P., Rasmussen, H. B., Ellinor, P. T., Gao, L., Lin, X., Li, L., Wang, L., Xiao, K., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, S., Liang, D., Peng, L., Jespersen, T., & Chen, Y. H. (2010). Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 86, 872-880.

Yu, L., Stewart, N. A., & Veenstra, T. D. (2010). Proteomics. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*, 89-96.

15. Anexo de protocolos

Medio LB para bacterias.

Para preparar un litro agregar:

25 g de Medio LB (Sigma Aldrich) en agua bidestilada.

Esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C. Si se requiere el medio con antibiótico agregarlo a una concentración final de 100 µg/mL.

Cajas de LB/agar

Para un litro preparar:

40 g de Medio LB/agar (Sigma Aldrich) en agua bidestilada.

Esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C. Dejar enfriar hasta 40 °C. Vaciar de 20 a 25 mL de medio en cajas Petri de 10 cm, esperar a que se solidifique y guardar a 4 °C. Si se requieren con antibiótico, cuando el medio este en 40 °C, agregar a una concentración final de 100 µg/mL.

Buffer TBE para gel de agarosa y de corrida para muestras de DNA

Para preparar un litro de un stock 5x agregar:

54 g de Tris-base

20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0

27.5 g de ácido bórico

Llegar al aforo con agua bidestilada.

Diluir 5 veces para obtener 1x y correr el gel.

Gel Red para muestras de DNA

Diluir Gel Red (Sigma Aldrich) 1:15 con agua BM.

Gel de agarosa al 1% para correr muestras de DNA

Pesar 0.3 g de agarosa y diluirlo en 30 mL de buffer TBE 1x

Calentar por 1 min en el horno de microondas. Ya que se enfrió un poco vaciarlo a una cámara de electroforesis para que solidifique.

Cargar 10 μ L de muestra con 2 μ L de buffer de corrida y 1 μ L de Gel Red diluido.

Correr a 80 mV por 40 min.

Purificación de DNA a partir del gel de agarosa

Cargar la muestra en el gel de agarosa al 1% y correrla a 100 V durante 30 minutos con TBE 1x.

Observar en el transiluminador la muestra en el gel y cortar la banda con una navaja nueva. Pasar el fragmento del gel a un tubo de 1.5 mL.

Tener un termoblock a 50 °C y 95 °C.

Verter 400 μ L de buffer de solubilización del gel G1 al tubo con el gel y 900 μ L de isopropanol

Calentar el tubo a 50 °C y mezclar con vórtex cada 3 minutos, repetir tres veces.

Pasar a una columna miniprep (2 veces 750 mL) y se centrifuga a 13000 rpm por 1 minuto a TA.

Colocar 500 μ L de Buffer G1 y se centrifuga con las mismas condiciones anteriores. Repetir dos veces más.

Poner 750 μ L de buffer de lavado y se deja filtrar 5 min a TA. Centrifugar igualmente y tirar el sobrenadante. Repetir de nuevo.

Agregar 30 μL de agua BM a la columna, dejar incubar por 5 min a TA y centrifugar.

Minipreparación Qiagen para obtención de DNA.

En 5 mL de medio LB con antibiótico inocular una colonia de bacterias. Incubar toda la noche en agitación a 37 °C.

Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos, tirar el sobrenadante y resuspender en pellet en 250 μL de P1.

Vaciar a un tubo de 1.5 mL y agregar 250 μL de P2. Mezclar por inversión 5 veces y agregar 350 μL de buffer N3. Mezclar por inversión.

Centrifugar 10 minutos a 4 °C a 13000 rpm, el sobrenadante se pasa a la columna del kit de QIAGEN y centrifuga por 1 minuto a 4 °C a 13000 rpm.

Agregar 500 μL de buffer PB y centrifugar con las mismas condiciones pasadas.

Lavar con 750 μL de buffer PE y centrifugar. El sobrenadante se desecha.

Para eliminar los restos de los buffers y otros componentes, centrifugar y desechar el sobrenadante.

La columna se coloca en un tubo nuevo de 1.5 mL y agregar 50 μL de agua BM. Dejar la columna con agua a TA por 5 minutos.

Por último, centrifugar la columna por 2 minutos a 4 °C a 13000 rpm.

Finalmente se obtienen 50 μL de DNA.

Midipreparación para la obtención de DNA

Se necesita: una hielera con hielo y un vaso con agua y cloro para los desechos.

Esterilizar 2 tubos de 80 mL de centrifuga, dos tubos de Nalgene de 30 mL y dos tubos córex de 30 mL a 121 °C por 15 minutos en autoclave.

Incubar una colonia de bacterias en 5 mL de medio LB con antibiótico durante 8 horas a 37 °C en agitación.

Tomar 200 µL a 500 µL de medio e incubar en 100 mL de medio LB con antibiótico por toda la noche a 37 °C en agitación.

Colocar los 100 mL del medio LB con bacterias en 2 tubos estériles de 80 mL. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se tira en el vaso con cloro.

A cada tubo agregar 2 mL de buffer P1 y resuspender el pellet con pipeteo y vórtex. Pasar a un tubo Nalgene estéril.

Agregar 4 mL de buffer P2 y mezclar por inversión. Incubar por 5 minutos a TA. Agregar 4 mL de buffer P3 frío y mezclar por inversión.

Incubar en hielo por 15 minutos y centrifugar a 12000 rpm 40 minutos a 4 °C.

Equilibrar la columna que viene en el kit QIAGEN con 4 mL de buffer QBT. Poner un cuadrado de gasa estéril en la parte superior de la columna, para pasar por aquí el sobrenadante y evitar que se tape.

Pasar el sobrenadante por la columna con ayuda de una pipeta estéril de 5 mL. Lavar la columna con 10 mL de buffer QC dos veces.

Eluir el DNA que se retuvo con 5 mL de buffer QI a la columna y recuperar el DNA en un tubo falcon de 50 mL.

Agregar 3.5 mL de isopropanol BM y agitar bien. Pasar el sobrenadante a un tubo córex de vidrio y centrifugar a 12000 rpm por 40 minutos a 4 °C. Tirar el sobrenadante.

Lavar el pellet con 2 mL de etanol 70 % a TA y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Tirar el sobrenadante.

Secar el pellet durante 10 minutos hasta eliminar el etanol. Resuspender en 400 mL de agua BM y pasarlo a un tubo de 1.5 mL.

Preparación de células competentes

Incubar 5 mL de medio LB con una colonia bacteriana DH5 α , o con 10 μ L del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación constante.

Inocular 20 mL de medio LB con 200 μ L del cultivo bacteriana anterior a 37 °C con agitación constante.

Dejar crecer las bacterias hasta que alcance una O. D. entre 0.3 o 0.5 a 600 nm aproximadamente 3 horas.

Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de disolución A fría. Llevar las células a un volumen final de 10 mL con la disolución A y centrifugar como el paso anterior. Eliminar el sobrenadante.

Resuspender el pellet en 1 mL de disolución B fría. Llevar a 10 mL con la disolución B.

Incubar en hielo por 30 minutos y centrifugar las células a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante y secar el tubo lo mejor que se pueda.

Suavemente resuspender las células en 2 mL de disolución B.

Hacer alícuotas de 200 μ L en tubos de 1.5 mL y agregar 20 μ L de glicerol estéril. Mezclar por inversión y congelar en hielo seco. Almacenar a -70 °C.

Disolución A

Disolución B

Cloruro de rubidio 10 mM

Cloruro de rubidio 10 mM

MOPS 10 mM pH 7.0

Cloruro de calcio 50 mM

MOPS 100 mM pH 6.5

Se deben preparar un día antes y se filtran antes de utilizarlas.

Transformación por choque térmico

Tener listo hielo y un termoblock a 42 °C.

Mezclar 200 µL de células competentes con 0.5 µg de DNA de plásmido en un tubo de 1.5 mL.

Incubar sobre hielo 30 minutos.

Dar un shock térmico a 42 °C durante 2 minutos. Inmediatamente después enfriar las células por unos segundos sobre el hielo. Cambiar el termoblock a 37 °C.

Agregar 1 mL de medio LB en condiciones estériles e incubar a 37 °C durante 1 hora.

Centrifugar a 25000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µL de medio LB.

Agregar los 200 µL a una caja de cultivo bacteriano con antibiótico.

Incubar a 37 °C entre 12-14 horas.

Checar el número de colonias.

Lisado de células

Preparar 672 µL de buffer RIPA con 28 µL de inhibidor de proteasas (stock 25X).

Sacar los cultivos de la incubadora, retirar medio y lavar tres veces con 5 mL de PBS.

Se adiciona 700 µL de buffer RIPA por cada caja de células y se mantienen en agitación durante 15 minutos sobre hielo.

Las células se despegan con una espátula estéril y se colectan en un tubo eppendorf.

Los lisados se mantienen en agitación sobre hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a 10000 rcf por 10 minutos a 4 °C.

Por último, el sobrenadante se recupera en un tubo nuevo como el total de proteínas celulares.

Cuantificación de proteínas

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

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

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

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

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

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

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

Leer absorbancias a 750 nm.

Buffer RIPA

Trizma Base 50mM pH8

EDTA 5 mM

NaF 20 mM

NP40 1%

SDS 0.1%

NaCl 150 mM

PBS

Se utilizan tabletas de PBS (Sigma), las cuales se disolvieron según las indicaciones del fabricante. Brevemente, cada tableta de PBS se disuelve en 200 mL de agua desionizada.

DMEM

Se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, pesar la cantidad requerida de DMEM y disolver en agua bidestilada.

Adicionar bicarbonato de sodio (3.7 g/L) y glucosa (3.5 g/L).

Ajustar pH entre 0.2 a 0.3 unidades por debajo del deseado, pH 7.4

El pH aumenta entre 0.1 a 0.3 unidades después de la filtración.

Ajustar el volumen final con agua bidestilada.

Inmediatamente filtrar en membranas de 0.2 μ m.

Opti-MeM

Se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, pesar la cantidad requerida de Opti-MEM y disolver en agua bidestilada.

Adicionar bicarbonato de sodio (2.4 g/L).

Ajustar pH entre 0.2 a 0.3 unidades por debajo del deseado, pH 7.4

Ajustar el volumen final con agua bidestilada.

Esterilizar por filtración con membranas de 2 μ m.

Inhibidor de proteasas 25x

1 tableta de inhibidor de proteasas complete (Roche) en 2 mL de PBS.

Geles de acrilamida de 1 mm de espesor para electroforesis

Gel separador al 10% (Para preparar 2 geles)

4.0 mL de agua bidestilada

3.3 mL de acrilamida al 30%

2.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8)

0.1 mL de SDS al 10%

0.1 mL de persulfato de amonio al 10%

0.004 mL de TEMED

Gel concentrador (para 2 geles)

2.7 mL de agua bidestilada

0.67 mL de acrilamida al 30%

0.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8)

0.04 mL de SDS al 10%

0.04 mL de persulfato de amonio al 10%

0.004 mL de TEMED

Primero colocar la disolución del gel separador, una vez que polimeriza, poner la disolución del gel concentrador.

Preparación de disoluciones para electroforesis

Buffer para electroforesis 5x

15.1 g de Tris base

72 g de Glicina

5 g de SDS

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

Buffer de transferencia para preparar 1L

0.303 g de Tris base

1.44 g de Glicina

20 mL de metanol

Llevar al aforo con agua bidestilada a 1 L.

Buffer TBS

NaCl 137 mM

Tris base 20 mM

Ajustar pH a 7.6

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

Revelado del Western Blot

Preparación del reactivo Quimioluminiscente.

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

Stripping

Buffer para stripping

100 mM de β -mercaptoetanol

2% de SDS

62.5 mM de Tris-HCl pH 6.7

Sumergir la membrana de PVDF en este buffer e incubar a 60 °C durante 30 minutos con agitación ocasional.

Lavar la membrana con TBS-T por 10 minutos a TA. Repetir tres veces.

Bloquear la membrana por sumersión en una solución al 5 % de leche libre de grasa en TBS-0.1% Tween durante 1 hora a TA con agitación leve.