



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio funcional del dominio sensor de voltaje del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide de mamífero

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

César Arcos Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Takuya Nishigaki

[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Carmen Nina Pastor Colón

[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)

Dr. León David Islas Suarez

[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Cuernavaca. Abril, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la supervisión del Dr. Takuya Nishigaki. Para la realización del proyecto se recibieron los siguientes apoyos económicos:

- CONACyT (A1-S-8768)
- PAPIIT (DGAPA IN205719, IN205722).
- Beca de manutención por parte del CONACYT, No. de CVU: 662105.
- Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Este trabajo recibió la siguiente asesoría

Asesoría técnica en laboratorio:

M. en C. Yoloxochitl Sánchez Guevara.

M. en C. Paulina Torres Rodríguez.

Biol. José Luis de la Vega Beltrán.

Auxiliares de laboratorio:

Jorge A. Blancas Naranjo.

Miguel A. Trujillo.

Apoyo administrativo:

Cinthy Olvera

Apoyo administrativo de la coordinación del posgrado:

J. Antonio Bolaños Guillen.

Gloria Villa Herrera.

Servicios computacionales:

M. en T. I. Juan Manuel Hurtado.

MEM. David Santiago Castañeda Carreón.

Ing. Roberto Rodríguez Bahena.

M.C. Arturo Ocádiz Ramírez.

Unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM:

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín.

M. en C. Jorge Arturo Yáñez.

M. en C. Eugenio López Bustos.

Biblioteca:

B.A. Dip. Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth.

Lic. I. Omar Arriaga.

Índice

Resumen	5
Abreviaturas	7
Introducción	9
Proteínas específicas de los espermatozoides de mamífero.	9
El intercambiador Na ⁺ /H ⁺ específico del espermatozoide (sNHE).	10
Posible papel fisiológico del dominio sensor de voltaje del sNHE de ratón (msNHE _{VSD}) y humano	13
Estructura del VSD y proteínas que lo contienen.	15
Uso de proteínas quiméricas formadas por VSDs y dominios de otras proteínas	15
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Materiales y métodos	21
Materiales	21
Tabla de información de los PCRs y oligonucleótidos (sNHE de ratón).	21
Clonación del VSD del sNHE de ratón (msNHE _{VSD}).....	23
Mutagénesis y construcción de proteínas quiméricas	23
Cultivo celular y transfección.....	29
Electrofisiología	30
Visualización de la expresión de proteínas usando microscopia de fluorescencia	31
Resultados	32
Clonación del msNHE _{VSD}	32
Inserción y posterior supresión de un codón de paro ambar.....	38
Inserción de un intrón	42
Caracterización de la corriente iónica producida por el msNHE _{VSD}	45
Determinación del potencial de inversión de la corriente iónica a través del msNHE _{VSD}	46
Corriente de compuerta del msNHE _{VSD}	48
Comparación de la densidad de corriente de las proteínas quiméricas del msNHE _{VSD}	51
Discusión	53
Causas probables de la aparición de deleciones en el VSD	54
Estrategias usadas para prevenir la toxicidad de un gen.....	55
Uso de la supresión del codón de paro ambar e inserción de un intrón para la preparación de plásmidos que codifiquen proteínas tóxicas para bacterias.....	56
Corriente iónica a través del msNHE _{VSD} y otras proteínas	58
Corriente de compuerta del msNHE _{VSD} y su dependencia al voltaje	60
Posible relación funcional entre el sNHE y otras proteínas específicas del espermatozoide.....	62
Conclusión	65
Referencias	66
Apéndice. Secuencias de ADN y aminoácidos de las proteínas quiméricas	73
Material suplementario	76

Resumen

El espermatozoide expresa diversas proteínas de manera exclusiva, las cuales tienen un rol fundamental para que la fecundación suceda de manera exitosa. Una de estas proteínas es el intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE), el cual es indispensable para la fertilidad en mamíferos. Sin embargo, hasta ahora solo existe un reporte en el que sNHE se expresó exitosamente en un sistema heterólogo. En ese trabajo, el intercambiador sNHE de erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) se caracterizó de manera detallada, confirmando su actividad de intercambio iónico y regulación a través de dos dominios, el sensor de voltaje (VSD) y el de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). En el presente trabajo nos propusimos realizar la caracterización del sNHE_{VSD} de ratón (msNHE_{VSD}), debido a que hay evidencia que indica, en esta especie, que el sNHE se regula mediante el potencial de membrana (E_m). En los espermatozoides de ratón, la inducción de una disminución del E_m (hiperpolarización) genera una alcalinización citosólica que no sucede en ratones nulos para el sNHE. En contraste con esta observación, en los espermatozoides de humano no hay cambios del pH intracelular (pH_i) después de la inducción de una hiperpolarización. Una posible explicación es que la diferencia en la cantidad y posición de aminoácidos con carga positiva del segmento cuatro (S4) del VSD de las dos especies resulten en una mayor sensibilidad al E_m en el sensor de ratón.

Para determinar el funcionamiento del sNHE_{VSD}, preparamos proteínas quiméricas del dominio VSD unido a una proteína fluorescente. Inesperadamente, el msNHE_{VSD} es tóxico en *E. coli*, por lo que nos centramos en el dominio de la proteína de ratón para resolver dicho problema. Fuimos capaces de evitar la toxicidad del dominio mediante la preparación de proteínas quiméricas junto con el uso de dos estrategias: La inserción de un intrón pequeño y la supresión de codones de paro ambar. Posteriormente, expresamos en un sistema heterólogo (células de mamífero HEK293) las construcciones que preparamos. En dicho sistema de expresión, registramos una corriente iónica dependiente de Cl^- extracelular. Finalmente, registramos la corriente de compuerta del msNHE_{VSD}, la cual es una evidencia directa de la integración del dominio en el ancho de la membrana celular y

su sensibilidad al voltaje (funcionalidad del dominio). Con este último resultado podemos concluir que el $sNHE_{VSD}$ de ratón es sensible al voltaje. La activación por voltaje del VSD podría influir en la actividad del $msNHE$ cuando se hiperpolariza el potencial de membrana, lo cual refuerza la propuesta de que este intercambiador participa en diversos procesos fisiológicos en el espermatozoide.

Abreviaturas

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico (por sus siglas en inglés)

Catsper: Canal de Ca^{2+} específico de espermatozoide

CHO: Células de ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés)

CiVSP: Fosfatasa dependiente de voltaje de *Ciona intestinalis*

CNBD: Dominio de unión a nucleótidos cíclicos

Em: Potencial de membrana

Hv1: Canal de H^+

Kcv: Canal viral de K^+

Kvsynth1: Proteína quimérica con el VSD de CiVSP unido al canal Kcv

Mohm: MegaOhms

msNHE_{VSD}: Dominio sensor de voltaje del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide de ratón

mV: milivoltios

NMDG: N-Metil-D-Glucamina

pA: picoamperios

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

pH_i: pH intracelular

RT-PCR: PCR de transcripción inversa

sAC: Adenil ciclasa soluble

Slo3: Canal de K^+ específico de espermatozoide codificado por el gen Kcnu1

sNHE: Intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide

sNHE_{VSD}: Dominio sensor de voltaje del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide

UAA: Aminoácido no natural

VSD: Dominio sensor de voltaje (por sus siglas en inglés: voltaje sensing domain)

Introducción

La actividad de las proteínas se regula mediante distintos tipos de estímulos como el pH, la concentración de algunos ligandos, etc. Particularmente, las proteínas sensibles a voltaje se regulan mediante cambios en el potencial de membrana (E_m). La mayor parte de estas proteínas tienen un dominio sensor de voltaje (VSD por sus siglas en inglés). El grupo más estudiado con un VSD (o VSDs) son los canales iónicos dependientes de voltaje. Sin embargo, existen otros tipos de proteínas que también cuentan con un VSD, como la fosfatasa sensible a voltaje y el intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE por sus siglas en inglés). Experimentos en espermatozoides de ratón sugieren fuertemente que el sNHE es sensible al E_m , lo que provoca una alcalinización citosólica que podría regular a otras proteínas del espermatozoide.

Proteínas específicas de los espermatozoides de mamífero.

El presente proyecto se centró en estudiar un dominio particular del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE), sin embargo, este transportador no es la única proteína de expresión específica para este tipo celular. Varias proteínas específicas del espermatozoide (Figura 1) junto con otras de expresión ubicua se encargan de regular diversos procesos como la movilidad y la reacción acrosomal (Wachten et al., 2017). De manera particular, el sNHE podría estar directamente relacionado con la regulación del canal de Ca^{2+} Catsper (el cual también es específico de espermatozoide). Catsper es sensible al pH intracelular (pH_i), por lo que se activaría mediante la alcalinización dependiente de voltaje producida por la actividad del sNHE (Kirichok et al., 2006). Otra proteína específica del espermatozoide es el canal selectivo a K^+ , Slo3, que participa en el establecimiento de un E_m hiperpolarizante durante la capacitación del espermatozoide (Santi et al., 2010). De acuerdo con un reporte previo, existe la posibilidad de que la hiperpolarización generada por Slo3 active al sNHE mediante su dominio sensor de voltaje (VSD) (Chávez et al., 2014).

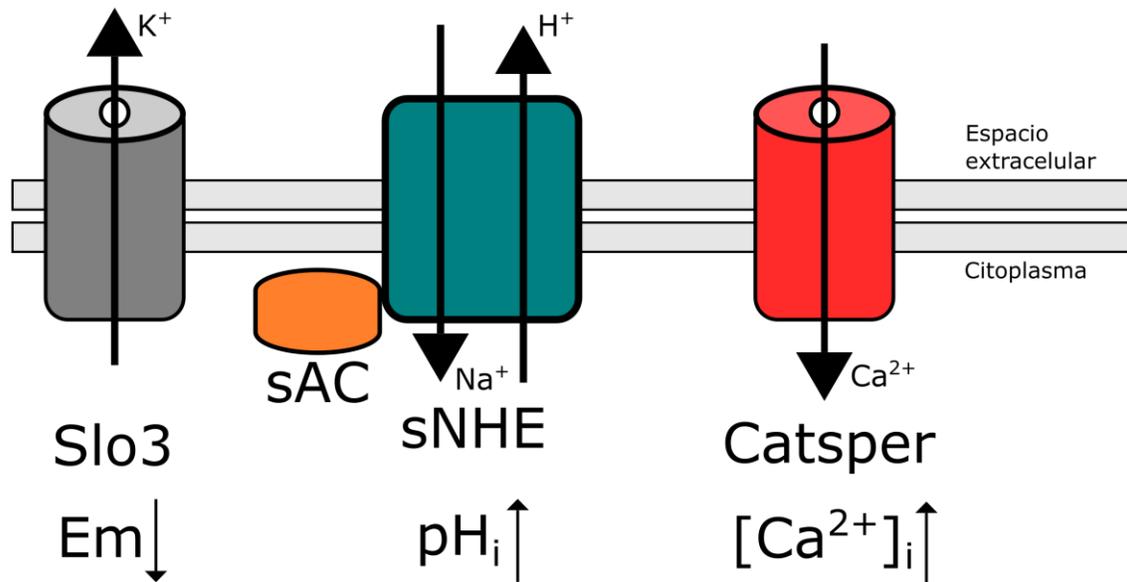


Figura 1. Relevancia fisiológica de las proteínas específicas del espermatozoide. Esquema de algunas proteínas específicas del espermatozoide. La adenilil ciclasa soluble (sAC por sus siglas en inglés) se encarga de aumentar los niveles de AMPc. En ratones, se reportó que existe una codependencia en la expresión de la sAC y el sNHE. Además, el canal selectivo a K^+ , Slo3, produce una hiperpolarización durante la capacitación, lo cual podría relacionarse a la activación del sNHE. Finalmente, está el canal de Ca^{2+} dependiente de pH, Catsper, cuya actividad podría estar relacionada a la del sNHE. Los detalles sobre la relación funcional entre estas proteínas no se han descrito, por lo que se siguen realizando estudios enfocados en entender la participación de estas y muchas otras proteínas en la regulación de la movilidad de los espermatozoides.

El intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE).

El intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE) es una proteína esencial para la regulación del pH citosólico. A pesar de que el primer trabajo sobre el sNHE en ratón se publicó en 2003, sus características particulares aún no se reportan para esta especie ni para humano, que al igual que otras especies, cuenta con dos proteínas que codifican para

NHEs específicos del espermatozoide: la proteína ortóloga (SLC9C1) o la paróloga (SLC9C2) de humano (Gardner & James, 2023; Wang et al., 2003). De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, el sNHE se compone de tres dominios: 1) de intercambio iónico, 2) sensor de voltaje (VSD) y 3) de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) (Figura 2). Los ratones nulos para el sNHE son infértiles y sus espermatozoides tienen problemas severos en la movilidad. Esta se puede recuperar parcialmente elevando el pH citosólico de manera artificial (con NH₄Cl) y totalmente usando análogos del AMP cíclico (cAMP) (Wang et al., 2003). Esta observación es importante porque la concentración de AMPc es muy relevante para el inicio de la movilidad, así como para la hiperactivación y para el proceso de capacitación (Buffone et al., 2014).

Aunado a la observación de que el cAMP promueve la recuperación de la movilidad de los espermatozoides nulos del sNHE, el mismo grupo reportó que hay una codependencia entre la expresión del sNHE y la adenil ciclasa soluble (sAC; Wang et al., 2007). De hecho, por resultados de estrategias bioinformáticas, sabemos que existe una estrecha relación evolutiva entre el sNHE, la sAC y Catsper, la cual es importante para la regulación de la movilidad de los espermatozoides en los metazoarios (Romero & Nishigaki, 2019). En concordancia con esta idea, los espermatozoides de ratones nulos para el sNHE no poseen la forma completa de la sAC. Es importante mencionar que en el mismo reporte y con la idea de estudiar la interacción molecular entre el sNHE y la sAC, intentaron expresar el sNHE en un sistema heterólogo sin éxito. Para esos experimentos usaron una proteína quimérica con fragmentos de los intercambiadores sNHE y NHE1, insertando los primeros 3 segmentos transmembranales del NHE1 en el sNHE. Sin embargo, la actividad de la proteína quimérica no fue la suficiente como para estudiar sus propiedades, por lo que no se realizó una caracterización detallada del intercambiador.

En contraste con la dificultad de trabajar con el sNHE en mamíferos, en 2018 se reportaron exitosamente las propiedades generales de la proteína ortóloga de erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Windler et al., 2018). En tal reporte, mediante la expresión de la proteína completa en células CHO (por sus siglas en inglés: Chinese Hamster Ovary cells), se obtuvieron las corrientes de compuerta del VSD (que son generadas por el

movimiento a lo ancho de la membrana celular de los aminoácidos con carga positiva del cuarto segmento transmembranal). Además, se observó que la dependencia al voltaje de las corrientes se modula por el CNBD mediante la concentración de nucleótidos cíclicos. Igualmente, usando fluorometría y patch-clamp, se corroboró que, ante un estímulo hiperpolarizante, el sNHE alcaliniza el pH citosólico. Cabe destacar que a diferencia del VSD de humano y ratón, el segmento cuatro del VSD de *S. purpuratus* tiene más aminoácidos con carga positiva (7 en comparación de los 3 y 4 en humano y ratón), lo que podría reflejarse en una mayor sensibilidad al voltaje (Figura 2).

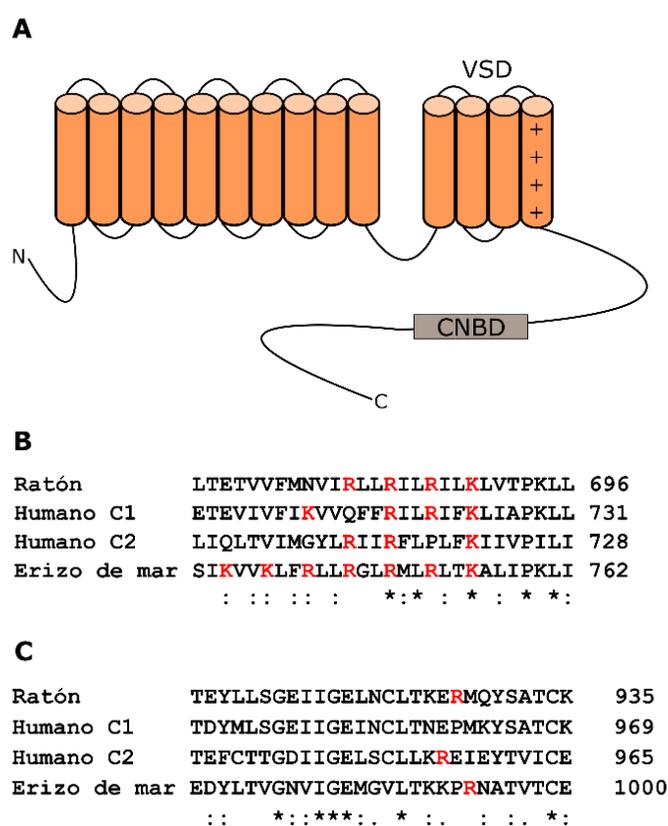


Figura 2. Estructura del intercambiador Na^+/H^+ específico del espermatozoide (sNHE). A) Esquema del sNHE de ratón (msNHE). La proteína se compone de tres dominios: de intercambio iónico (correspondiente a los primeros diez segmentos transmembranales), sensor de voltaje (VSD; compuesto por los siguientes cuatro segmentos transmembranales) y de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD; ubicado en el extremo carboxilo intracelular). Alineamiento de una región correspondiente

al segmento cuatro del VSD (B) y al casete de unión a fosfato (PBC por sus siglas en inglés) del dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) (C). En los dos paneles se resaltan aminoácidos con carga positiva que son relevantes para el funcionamiento de cada dominio.

Posible papel fisiológico del dominio sensor de voltaje del sNHE de ratón ($msNHE_{VSD}$) y humano

El espermatozoide se expone a diversas condiciones fisicoquímicas en el tracto genital masculino y femenino que promueven procesos como la capacitación, además de cambios en la movilidad. Uno de los parámetros fisiológicos que se modifican durante estos procesos es el potencial de membrana (E_m). Durante la capacitación, el E_m del espermatozoide de ratón pasa de ~ -40 mV a ~ -60 mV (Zeng et al., 1995). Esta modificación se asocia a la actividad del canal de K^+ Slo3, cuya activación genera la salida de K^+ con una consecuente hiperpolarización. Esta idea es apoyada por la observación de que, en los ratones nulos para este canal, el E_m en lugar de hiperpolarizarse, se depolariza después de la capacitación (Santi et al., 2010). Existe la posibilidad de que la hiperpolarización asociada a la capacitación active al sNHE a través de su VSD, lo que provocaría un cambio del pH citosólico debido a la salida de protones. Esta hipótesis es apoyada por dos reportes independientes en los que se observó que la hiperpolarización de los espermatozoides de ratón inducida por el ionóforo de K^+ , valinomicina, resulta en la alcalinización del pH citosólico (Chávez et al., 2014; Hernández-Garduño, Chavez, et al., 2022). Este no parece ser el caso para los espermatozoides de humano, ya que no se observaron cambios del pH citosólico después de realizar experimentos similares (Linares-Hernández et al., 1998; Hernández-Garduño, Chávez, et al., 2022) (Figura 3). Una posible explicación a tal resultado es que el $sNHE_{VSD}$ de humano es incapaz de responder a cambios del E_m debido a la falta de suficientes aminoácidos con carga positiva en la región S4 del VSD. En ratón hay cuatro aminoácidos con carga positiva, mientras que en humano solo hay tres de estos aminoácidos en las dos copias del gen (SLC9C1 y SLC9C2) (Figura 2).

Para confirmar la participación del sNHE en los procesos antes mencionados, es necesario desarrollar una estrategia que permita la expresión heteróloga correcta de las proteínas ortólogas de mamífero. Esto nos permitirá conocer sus propiedades particulares, así como se hizo con el intercambiador de erizo de mar (Windler et al., 2018).

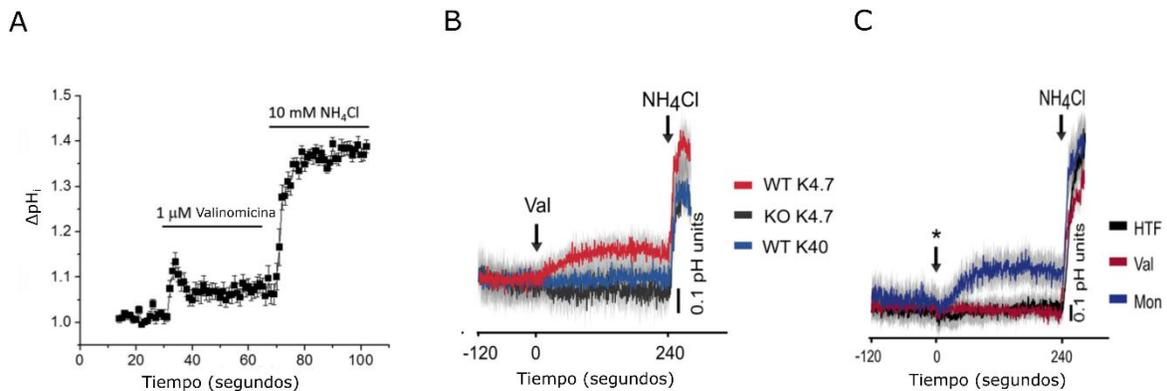


Figura 3. Los espermatozoides de ratón, pero no los de humano responden a la hiperpolarización del Em. A) Cambios del pH_i medidos mediante el uso del colorante sensible a pH BCECF-AM usando espermatozoides de ratón. Cambios del pH_i medidos mediante el uso del colorante sensible a pH Snarf-5F en espermatozoides de ratón (B) y humano (C). A y B) En los espermatozoides de ratón se observó un aumento del pH_i ante la adición de valinomicina (Val), la cual induce una hiperpolarización del Em. En el experimento del panel B, el aumento solo sucedió cuando la concentración de K^+ extracelular fue la fisiológica (WT K4.7). El pH_i no aumentó después de adicionar valinomicina en los espermatozoides de ratones nulos para el sNHE (KO K4.7) ni cuando la concentración de K^+ externo se aumentó a 40 mM (WT K40). En el caso de los espermatozoides de humano, se observa un aumento del pH_i solamente ante la adición de monensina (Mon), el cual es un ionóforo que intercambia Na^+ por H^+ . HTF representa la adición del medio en el que se encontraban las células. NH_4Cl se adicionó al final de los trazos como un control de los cambios del pH_i . Figuras tomadas de: Chávez et al., 2014 y Hernández-Garduño, Chávez, et al., 2022.

Los antecedentes expuestos en las secciones previas sugieren fuertemente que el sNHE de ratón se regula por cambios en el Em. Por otro lado, también es clara la dificultad que ha habido para expresar a la proteína completa en un sistema heterólogo, lo que ha impedido

el estudio de sus propiedades biofísicas. Debido a esta problemática, decidimos enfocarnos en estudiar al VSD de forma aislada, como se ha hecho con otras proteínas dependientes de voltaje.

Estructura del VSD y proteínas que lo contienen.

De manera general, los VSDs tienen cuatro segmentos transmembranales (S1-S4) y contienen un patrón de aminoácidos muy conservado en S4: varios aminoácidos con carga positiva (usualmente entre 3-7) con dos residuos hidrofóbicos entre ellos (Bezanilla, 2000; Catterall, 2010). Los aminoácidos con carga positiva son estabilizados por otros residuos con carga negativa de los segmentos S1-S3 (Kumánovics et al., 2002). Además del sNHE, el dominio sensor de voltaje se encuentra en diversos tipos de proteínas, siendo las más estudiadas los canales iónicos dependientes de voltaje, los cuales se componen del VSD y de un dominio del poro por donde los iones cruzan la membrana plasmática. Aunque los canales iónicos son el tipo de proteínas con VSD más estudiadas, existen otras proteínas cuya actividad se regula por el dominio sensor de voltaje. Una de las más estudiadas es la fosfatasa dependiente de voltaje, descrita inicialmente en *Ciona intestinalis* (CiVSP; Murata et al., 2005). Otro ejemplo de mucha relevancia es el canal de protones Hv1, compuesto solamente de cuatro segmentos transmembranales homólogos al VSD. La existencia de estas proteínas con VSD demuestra que el dominio tiene la ventaja de ser aislado y aun así mantener sus propiedades. Debido a esto, puede regular la actividad de distintos dominios proteicos.

Uso de proteínas quiméricas formadas por VSDs y dominios de otras proteínas

El uso de proteínas quiméricas que contienen un VSD ha aumentado en los últimos años, permitiendo el desarrollo de proteínas sintéticas para distintos propósitos. Un ejemplo de estas proteínas quiméricas es Kvsynth1, que se compone del VSD de CiVSP fusionado al

canal de K^+ viral Kcv (Arrigoni et al., 2013). Por sí mismo, el canal Kcv produce una corriente iónica con un comportamiento mayoritariamente lineal en relación con el voltaje, pero adquiere dependencia al voltaje en el rango positivo cuando se fusiona al VSD (Figura 4A). En un reporte posterior, el VSD de CiVSP se fusionó a la proteína fluorescente pHluorina (con lo que se obtuvo la proteína quimérica llamada Arclight). La proteína fluorescente presenta una mutación particular que aumenta considerablemente la dependencia al voltaje de su fluorescencia, con lo que se obtuvo un sensor de voltaje fluorescente genéticamente codificable (Figura 4B) (Jin et al., 2012). La obtención de este tipo de proteínas quiméricas demuestra la versatilidad de los VSDs y el hecho de que siguen siendo funcionales incluso estando unidos a otro tipo de proteínas.

Tomando en cuenta los ejemplos antes mencionados, decidimos preparar proteínas quiméricas del $msNHE_{VSD}$ con el canal Kcv o la proteína fluorescente pHluorina. Mediante la medición de la actividad de estas quimeras, pretendíamos demostrar la funcionalidad del VSD. Sin embargo, las proteínas quiméricas fueron tóxicas para *E. coli* lo que nos llevó a estudiar si la toxicidad era generada por el $msNHE_{VSD}$ y si esta podía evitarse mediante algún método alternativo para poder continuar con el estudio del dominio.

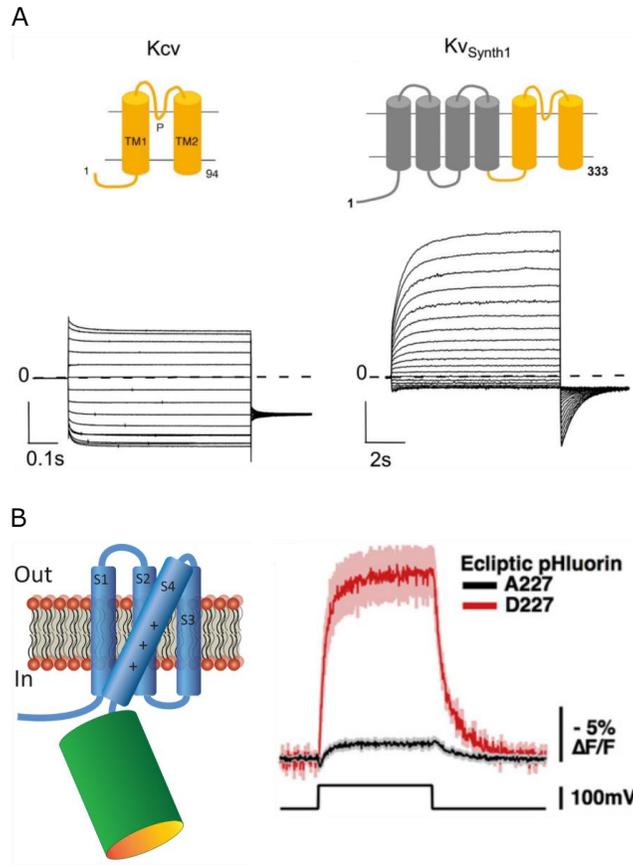


Figura 4. El dominio sensor de voltaje funciona como una proteína modular. Se muestran resultados de dos trabajos independientes en los que se aisló el dominio sensor de voltaje de CiVSP (CiVSP_{VSD}). A) Después de fusionar CiVSP_{VSD} al canal de K⁺ viral Kcv (para obtener la proteína Kvsynth1), la corriente a través del canal paso de tener un comportamiento mayoritariamente óhmico, a activarse principalmente a potenciales depolarizantes, similares a los que se activa la proteína CiVSP completa (Arrigoni et al., 2013). B) En el segundo caso, CiVSP fue fusionado a la proteína fluorescente pHluorina (para obtener la proteína Arclight; izquierda), cuya fluorescencia después de la fusión se volvió dependiente de voltaje (derecha), funcionando así, como un sensor del Em (Jin et al., 2012). Como se señala en la figura, la dependencia de voltaje fue mucho mayor en la mutante D227A, la cual se obtuvo de manera fortuita.

Con todo esto, en el presente proyecto se exponen resultados que muestran cómo logramos clonar de manera exitosa el VSD del sNHE de ratón (msNHE_{VSD}) en *E. coli*. Esto se consiguió, a pesar de la toxicidad que generó el dominio en bacterias, la cual fue causada

por una actividad de transporte iónico inesperada del VSD. Para evitar la toxicidad se usaron dos estrategias que impidieron la expresión del dominio en bacterias, las cuales serán detalladas más adelante. Además, demostramos mediante la medición de corrientes de compuerta, que el $msNHE_{VSD}$ responde a la hiperpolarización del Em, lo que es un fuerte indicio de su participación en diversos procesos fisiológicos del espermatozoide.

Justificación

Con relación a los antecedentes expuestos, consideramos que la evidencia experimental sugiere que el msNHE_{VSD} es funcional, sin embargo, aún es necesario realizar la caracterización del dominio y describir las diferencias que tiene con el VSD de otras especies.

Hipótesis

La toxicidad generada por el dominio msNHE_{VSD} puede ser eliminada mediante el uso de estrategias que eviten su expresión en bacterias, lo que permitirá el estudio del dominio en las células HEK293 de humano.

Una vez expresado en las células HEK293, se registrará la actividad del msNHE_{VSD}, la cual será regulada por el potencial de membrana, particularmente a valores hiperpolarizantes.

Objetivo general

Estudiar la función del msNHE_{VSD} expresado en las células HEK293 mediante técnicas de electrofisiología.

Objetivos específicos

- Realizar la inserción de un pequeño intrón quimérico (VSD_{intrón}), así como la mutación de una tirosina por codón de paro ambar (VSD_{Y665Amb}) en el msNHE_{VSD}
- Mejorar la expresión en la membrana plasmática del plásmido codificante para VSD_{intrón} mediante la inserción del N-terminal de Ci-VSP y de las secuencias de exporte del Golgi y del retículo endoplásmico del canal Kv2.1
- Confirmar la correcta obtención de los plásmidos codificantes para las proteínas quiméricas, así como su expresión en las células HEK293
- Realizar experimentos de electrofisiología para registrar la actividad del msNHE_{VSD}

Materiales y métodos

Materiales

Todas las enzimas de restricción fueron de Thermo Fisher Scientific. Las ADN polimerasas usadas para la amplificación por PCR fueron Vent (New England Biolabs) y Platinum SuperFi (Invitrogen). Las construcciones se transformaron en las cepas DH5 α y JM109(DE3) de *E. coli*.

Tabla de información de los PCRs y oligonucleótidos (sNHE de ratón).

No. de PCR	Objetivo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
1	Para la clonación del VSD del sNHE de ratón	1F: TCG GAC ATT TCT CTC GGT T	1R: TAT CTG CTG GCT CAT CCT T
2	Para la subclonación de Kvsynth1-GFP (CiVSP _{VSD} -Kcv-GFP) en el plásmido pCAGEN	2F: CGC CGG AAT TCA CCA TGG AGG GAT TTG AC (EcoRI)	2R: GGA AAG GAC AGT GGG AGT GG
3	Para la amplificación del VSD del sNHE de ratón y la inserción de sitios de restricción	3F: GCG GGA ATT CAC CAT GGT CTT CAC AAA TGA (EcoRI)	3R: CGG CTC TTC TTT TGG TGT TAC AAG C (Lgul)
4	Para la amplificación de Kcv-GFP del plásmido pCAGEN CiVSP _{VSD} -Kcv-GFP	4F: CCG CTC TTC CAA AAA TGT TAG TGT TTA GTA A (Lgul)	4R: AGC CTG CAC CTG AGG A
5	Para la amplificación del producto ligado (msNHE _{VSD} -Kcv-GFP)	3F	4R
6	Para la amplificación del VSD del sNHE de ratón que sustituyó el VSD de ArcLight-Q239 (pCS2+)	6F: CCC AAG CTT ACC ATG GTC TTC ACA AAT GAA TTT GAA TAT ACT GG (HindIII)	6R: CAC GGA TCC CCC AGT AGT TTT GGT GTT ACT AGC TTC AAG ATG CGC AG (BamHI)

7	PCR7 para la mutación sitio dirigida de pJET1.2 msNHE _{VSD} (Y665Ambar)	7F: CCA TTA GTT AGA ATT TTG ACT TAA CTG AGA CTG TGG T	7R: CAA AAT TCT AAC TAA TGG AGT CTG TTT CGA TAA G
8	PCR8 para la amplificación de msNHE _{VSDY665Ambar}	6F	6R
9	Para la amplificación del extremo N-terminal del msNHE _{VSD}	6F	9R: CCC GCT CTT CAC TTA CCT TCC TCA TTG CTG CCA CCT TAA (Lgul)
10	Para la amplificación del intrón	10F: CGG GCT CTT CTA AGT ATC AAG GTT ACA AGA CAG GTT TAA G (Lgul)	10R: CCG CGT CTT CCT GTG GAG AGA AAG GCA AAG TGG A (Lgul)
11	Para la amplificación del extremo C-terminal del msNHE _{VSD}	11F: CCC GCT CTT CTA CAG GAA TTT TTT TCA CAC ACC TGG CTC (Lgul)	6R
12	Para la amplificación de msNHE _{VSD} intrón	6F	6R
13	Para la amplificación de NtVSP con la primera mitad de la secuencia de exporte del Golgi	13F: GAC GTA AAT GGG CGG TAG GCG TG	13R: CCG CTC TTC ACA CGA AAC TGG ACG CGA (Lgul)
14	Para la amplificación de msNHE _{VSD} intrón con la segunda mitad de la secuencia de exporte del Golgi	14F: CCG CTC TTC CGT GTT TTT GAA TAT ACT GGA TAC CTT GTG G	6R
15	Para la amplificación del producto ligado (NtVSP _{GolgiExp} VSD _{intrón})	13F	6R
16	Para la amplificación de pHluorinaERExp	16F: GAC GTA AAT GGG CGG TAG GCG TG	16R: GGG CTC TTC TTC ATT TTC ATA GCA AAA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC AT (Lgul)
17	Para la amplificación de ERExp3'UTR	17F: GGG CTC TTC ATG AAG TTT GAC TCG AGT CTA GAA CTA TAG TGA GTC GTA TT (Lgul)	17R: CGC CCG GGA GCT ATT TGC AAA AGC CTA GGC CT (SmaI)

18	Para la amplificación de pHluorin _{ERExp} 3'UTR	16F	17R
----	---	-----	-----

Clonación del VSD del sNHE de ratón (msNHE_{VSD})

Se aisló ARN total de tejido testicular de ratones CD1 usando TRIzol (Cat: #15596026 de Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo disponible en <https://www.thermofisher.com/>. Usando el ARN aislado como templado, se amplificó mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR) un fragmento de ADN correspondiente a la región donde se encuentra el VSD, usando para ello los siguientes oligonucleótidos: 1F y 1R. El fragmento de ADN amplificado fue purificado mediante una columna de sílice (Cat: #D4004 de Zymo Research) y ligado al vector pJET1.2 usando el kit CloneJET (el cual no requiere de extremos cohesivos en el fragmento amplificado; Thermo Fisher Scientific) con lo que se obtuvo la construcción pJET1.2 msNHE.

Mutagénesis y construcción de proteínas quiméricas

En todos los procedimientos detallados en esta sección, purificamos los fragmentos de ADN (productos de PCR y los obtenidos después de digerir con enzimas de restricción) usando columnas de sílice (Cat: #D4004 de Zymo Research). Utilizamos el servicio de secuenciación de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM para confirmar la secuencia de ADN de los insertos de todos los plásmidos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de todos los plásmidos usados están en el apéndice al final del texto.

Proteína quimérica pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP

Con el fin de estudiar la actividad del msNHE_{VSD}, el dominio se unió al canal viral Kcv (Plugge et al., 2000). Para preparar la proteína quimérica, conseguimos el plásmido pcDNA3 Kvsynth1-GFP (donado por el grupo de la Dra. Sandra M. Bajjalieh de la Universidad de Washington, Seattle; Rosasco, Gordon, and Bajjalieh 2015), del cual tomamos el canal Kcv fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés). Antes de preparar

nuestra proteína quimérica, subclonamos la construcción Kvsynth1-GFP (o CiVSP_{VSD}-Kcv-GFP) en el vector pCAGEN. Dicho vector contiene el promotor sintético CAG, compuesto por el promotor AG (derivado del promotor de pollo AC) unido a la secuencia *enhancer* del promotor CMV-IE (Niwa et al., 1991). Primero amplificamos CiVSP_{VSD}-Kcv-GFP mediante el PCR2 con los oligonucleótidos 2F y 2R. El producto de PCR se clonó en el vector pCAGEN usando EcoRI y NotI como sitios de clonación (Figura 5) para obtener pCAGEN CiVSP_{VSD}-Kcv-GFP. Posteriormente, usamos el plásmido recién obtenido (pCAGEN CiVSP_{VSD}-Kcv-GFP) como templado para sustituir el VSD de CiVSP por el del sNHE de ratón. Para esto, el msNHE_{VSD} y el Kcv-GFP se amplificaron mediante los PCRs 3 y 4, respectivamente, utilizando como templados pJET1.2 msNHE_{VSD} y pCAGEN CiVSP_{VSD}-Kcv-GFP y los pares de oligonucleótidos 3F-3R y 4F-4R (Figura 5). Los dos pares de oligonucleótidos insertaron sitios de restricción para la enzima tipo IIS LgI y así poder usar el método FASTR/Golden Gate (Kotera & Nagai, 2008; Engler, Kandzia, and Marillonnet 2008), que también se usó en las siguientes secciones. Los fragmentos resultantes se digirieron simultáneamente con la enzima LgI y se ligaron, siendo el producto obtenido amplificado mediante el PCR5 con los oligonucleótidos 3F y 4R (Figura 5). El fragmento amplificado se purificó y ligó al vector pCAGEN usando EcoRI y NotI como sitios de clonación. Con este proceso se esperaba obtener la construcción pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP.

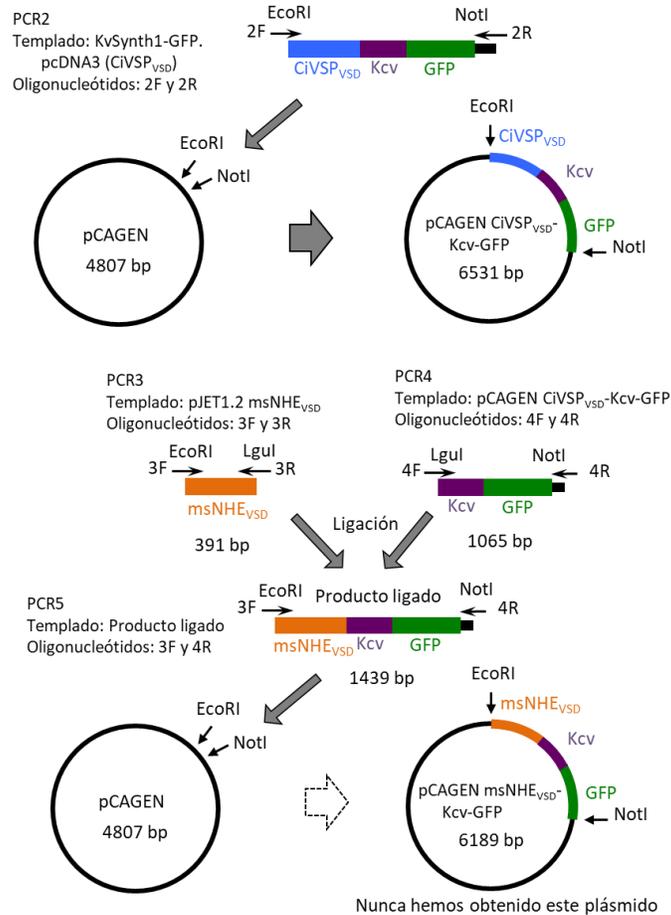


Figura 5. Obtención de la proteína quimérica pCAGEN msNHE_{vSD}-Kcv-GFP.

Proteína quimérica pCS2+ msNHE_{vSD}-pHluorina

El VSD del sNHE de ratón (msNHE_{vSD}) se amplificó mediante el PCR6 usando los oligonucleótidos 6F y 6R, mediante los cuales se insertaron los sitios de restricción HindIII y BamHI, respectivamente (Figura 6). Después, el dominio msNHE_{vSD} se ligó al plásmido pCS2+ Arclight-Q239 (Jin et al., 2012) usando HindIII y BamHI como sitios de clonación para reemplazar al VSD de CiVSP (Figura 6). Con este procedimiento se obtuvo la primera construcción quimérica del msNHE_{vSD} unido a la proteína fluorescente pHluorina (Ex. 490 nm/Em. 520 nm) pCS2+ msNHE_{vSD}-pHluorina.

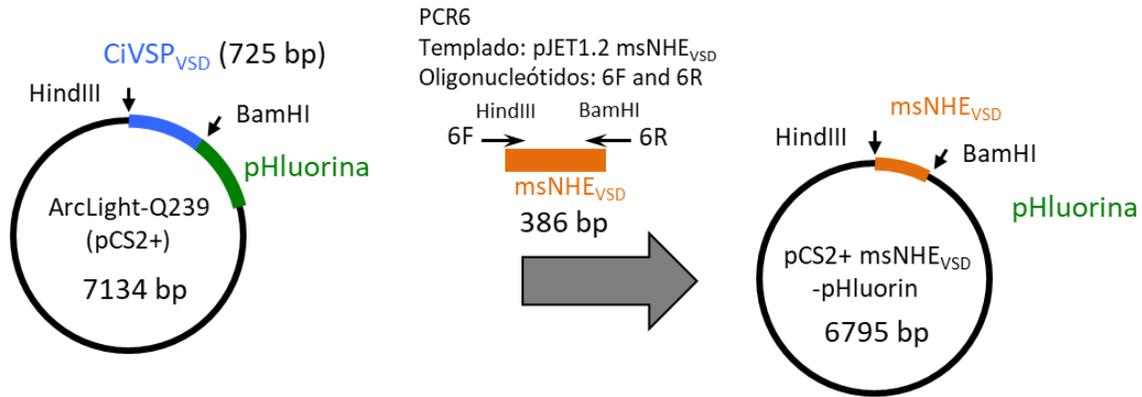


Figura 6. Obtención de la proteína quimérica pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina.

Inserción de un codón de paro ambar en la proteína quimérica pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina

Utilizando como templado el plásmido pJET1.2 msNHE_{VSD}, se insertó un codón de paro ambar en la posición que codifica la Tirosina 665 (TAC) (para obtener pJET1.2 VSD_{Y665Ambar}) mediante mutagénesis por PCR inverso (PCR7) usando los oligonucleótidos 7F y 7R (Zheng et al., 2004). Se amplificó el fragmento de ADN que codifica msNHE_{VSDY665Ambar} por el PCR8 usando pJET1.2 VSD_{Y665Ambar} como templado y los oligonucleótidos 6F y 6R (Figura 7). El producto de PCR8 se utilizó para sustituir al VSD de CiVSP en el vector pCS2+ usando los sitios HindIII y BamHI (Figura 7). Con esta estrategia se obtuvo el plásmido que codifica para msNHE_{VSD}-pHluorina con la mutación de la Tirosina 665 por un codón de paro ambar (pCS2+ VSD_{Y665Ambar}-pHluorina).

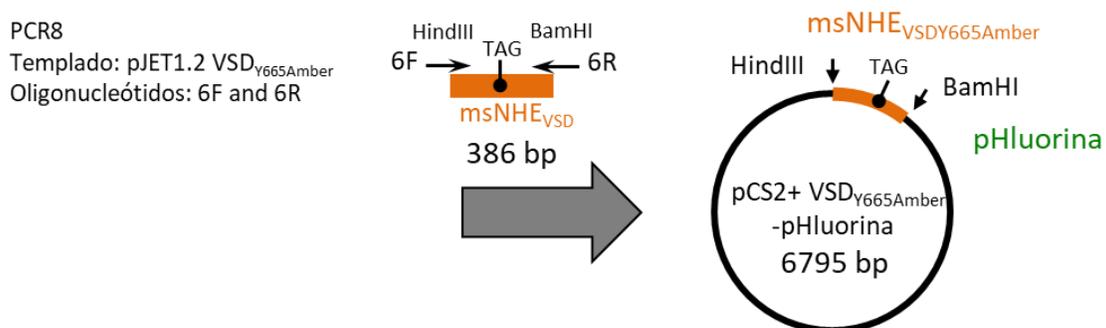


Figura 7. Obtención de la proteína quimérica pCS2+ VSD_{Y665Ambar}-pHluorina.

Inserción de un intrón pequeño en pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina (pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina)

Un intrón quimérico pequeño (de 133 pb formado por fragmentos de los intrones de β -Globina e IgG; Younis et al. 2010) se introdujo entre las bases AG y G de una región que codifica para el bucle extracelular entre el segundo y tercer segmento transmembranal del msNHE_{VSD}. El intrón fue amplificado mediante el PCR10 usando los oligonucleótidos 10F y 10R, los cuales contienen sitios de restricción para LglI (Figura 8). De manera paralela se amplificó el msNHE_{VSD} en dos partes con los PCRs 9 y 11 para insertar sitios de LglI usando los oligonucleótidos 6F y 9R para la región N-terminal, además de 11F y 6R para la región C-terminal (Figura 8). Los tres fragmentos obtenidos se digirieron con la enzima LglI y se ligaron. El producto de la ligación (msNHE_{VSD}intrón) se volvió a amplificar mediante el PCR12 (oligonucleótidos 6F y 6R) y se usó para reemplazar el VSD de pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina, por lo que tanto vector como inserto se digirieron con las enzimas HindIII y BamHI, para ligarse posteriormente y así obtener pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina (Figura 8).

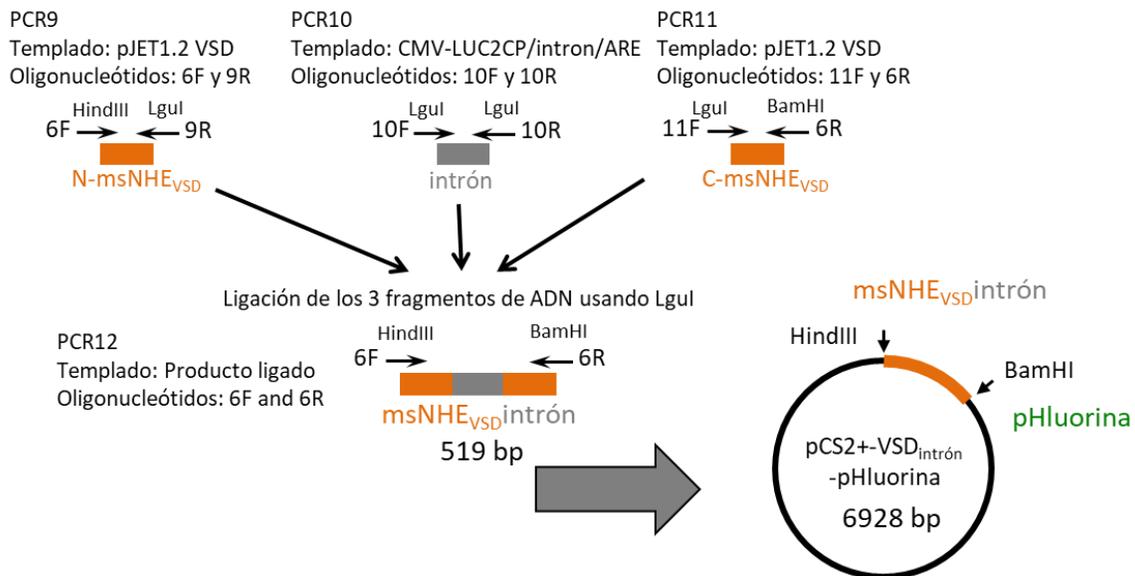


Figura 8. Obtención de la proteína quimérica pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina.

Proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq)

La construcción pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina se modificó para agregar el extremo N-terminal de CiVSP y las secuencias de exporte del Golgi y el Retículo endoplásmico del canal Kv2.1. El extremo N-terminal de CiVSP se usó previamente para mejorar la señalización a la membrana de la subunidad 3 de Catsper (Arima et al., 2018). Primero se amplificó la primera parte tanto del N-terminal de CiVSP como de la secuencia de exporte del Golgi (GolgiExp) por el PCR13 y la segunda parte del N-terminal de CiVSP y de GolgiExp unidos al VSD_{intrón} por el PCR14 (Figura 9). Se usaron los pares de oligonucleótidos 13F-13R (para el PCR13) y 14F-6R (para el PCR14). Los dos fragmentos tienen sitios de restricción para LguI, por lo que se digirieron simultáneamente con LguI y se ligaron. El producto de la ligación se volvió a amplificar mediante el PCR15 (oligonucleótidos 13F y 6R) y se usó para reemplazar el VSD_{intrón} en la construcción pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina, por lo que inserto y vector se digirieron con las enzimas HindIII y BamHI y se ligaron para obtener pCS2+ NtVSP_{GolgiExp}VSD_{intrón}-pHluorina (Figura 9). El plásmido recién obtenido se usó como templado para insertar la secuencia de exporte del Retículo endoplásmico. Primero se amplificó mediante los PCRs 16 y 17: 1) la parte final de pHluorina y la primera parte de la secuencia de exporte del Retículo endoplásmico (ERExp) y 2) la segunda parte de ERExp y una parte de la región 3' del vector pCS2+; para esto, se usaron los pares de oligonucleótidos 16F-16R y 17F-17R respectivamente. Los dos fragmentos se purificaron y se digirieron simultáneamente con LguI y después fueron ligados. El producto de la ligación se volvió a amplificar mediante el PCR18 (oligonucleótidos 17F y 17R) y se usó para reemplazar a la pHluorina y el extremo 3' por el fragmento con ERExp, usando BamHI y SmaI como sitios de clonación. De esta manera se obtuvo la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}-pHluorina (ExpSeq) (Figura 9).

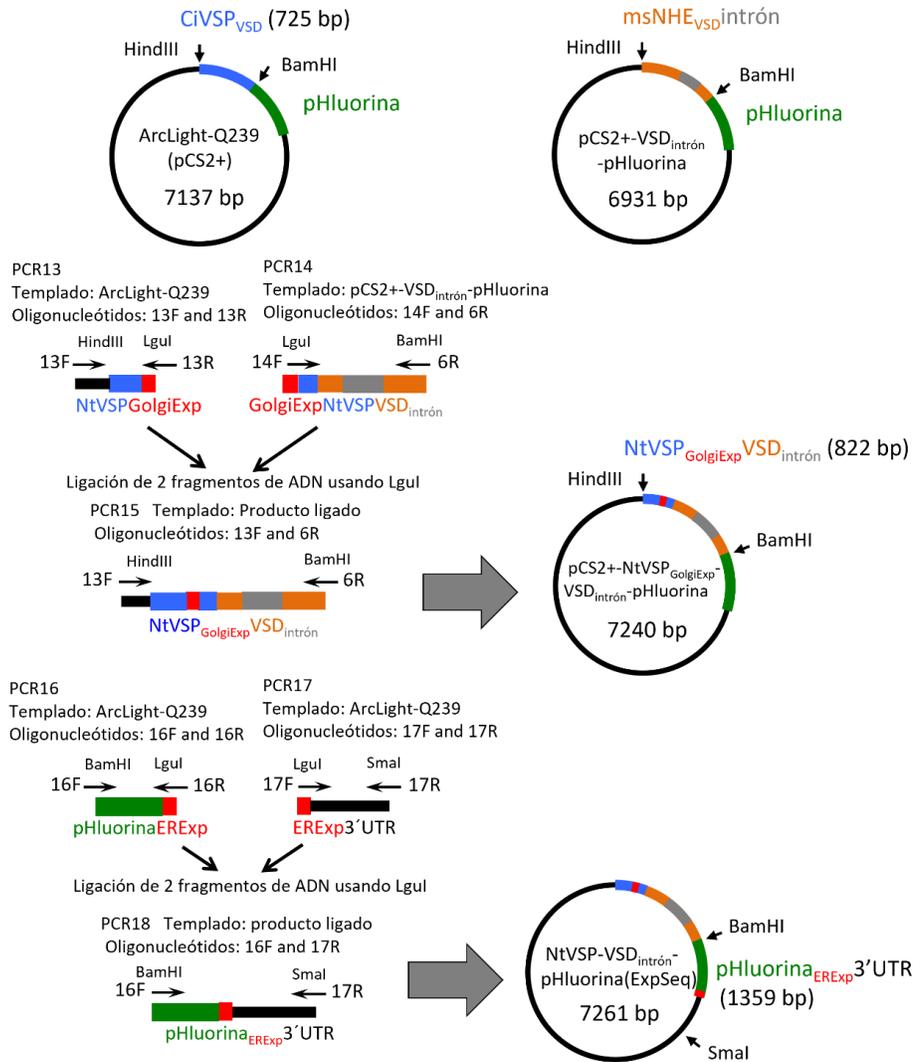


Figura 9. Obtención de la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq).

Cultivo celular y transfección

La línea celular HEK293 (por sus siglas en inglés: Human Embryonic Kidney 293) se cultivó utilizando el medio DMEM (por sus siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico (Estreptomicina 10,000 µg/ml y Penicilina 100 U/ml) /antimicótico (Amfotericina B 25 µg/ml). Los reactivos antes mencionados fueron de Gibco. Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmosfera de CO₂ al 4%. Se realizó la expresión transitoria de distintas proteínas mediante la transfección de los plásmidos correspondientes. El agente de transfección utilizado fue

jetPEI (Polyplus). Previa a la transfección, las células HEK293 se cultivaron en placas petri de 35mm. Después de 24 horas, se mezclaron 200 μ l de NaCl con el ADN (plásmido) a transfectar y 3 μ l (por cada μ g de ADN) de jetPEI. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se cambió el medio DMEM al cultivo de células HEK293 que se sembró el día anterior y se le adicionó la mezcla de transfección. Finalmente, la expresión de las proteínas exógenas en las células HEK293 se analizó a las 24 o 48 horas después de la transfección. Cuando las células se transfectaron con pCS2+ VSD_{Y665Ambar}-pHluorina y pMAH-MYRS, el medio DMEM se suplementó con 1 mM de L-Tirosina hasta la realización del experimento.

Electrofisiología

Para los experimentos de fijación de voltaje en micro áreas de membrana (“patch clamp”) en la configuración de célula completa (“whole cell”), usamos la siguiente solución interna (en mM): 133 NMDG-metanosulfonato, 5 NMDG-Cl (o 138 NMDG-Cl⁻), 0.2 MgCl₂, 10 EGTA y 10 HEPES. La solución externa tuvo la siguiente composición (en mM): 140 NMDG-Cl (o NaCl o NMDG-metanosulfonato), 3 KCl, 5 CaCl₂, 10 HEPES y 5 de Glucosa. El pH externo se ajustó a 7.4 con NMDG⁺ mientras que el interno a 7.4 o 6.4 con ácido metanosulfónico dependiendo del experimento. Para los registros de corriente macroscópica se usó un protocolo de pulsos de 300 ms de -80 a 80 mV con incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV (o -120 mV). Para los registros de corriente de compuerta, se usó un protocolo de pulsos cuadrados de 10 ms de -10 a -150 mV con decrementos de -10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -10 mV. Aunque observamos tanto la corriente entrante (ON) como la saliente (OFF), solo usamos el movimiento de carga (Q) obtenida de la integración de la corriente entrante para el análisis de la corriente de compuerta porque las corrientes salientes presentan una cinética más compleja como la reportada para el canal HCNL1 (Wobig et al., 2020). Para el registro de corrientes de cola, se usó un protocolo de pulsos con una estimulación inicial a 50 mV por 300 ms a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV seguida de pulsos a diferentes voltajes de -110 a 10 mV con incrementos de 10 mV. En todos los tipos de registros

electrofisiológicos se usó un protocolo de P/-4 antes de cada pulso con la intención de restar la corriente lineal durante el registro. Se utilizaron pipetas de borosilicato con una resistencia de 3-7 Mohm. Los registros de corriente iónica y de compuerta se muestrearon a 20 y 100 kHz respectivamente y se filtraron a 5 kHz (filtro Bessel de cuatro polos) mediante el uso de un amplificador Axopatch 200B y un convertidor analógico-digital Axon 1550B (Molecular Devices). Las corrientes capacitivas lineales se minimizaron usando la herramienta de cancelación de transitorios capacitivos del amplificador. La estimulación, adquisición y análisis de datos y los gráficos se realizaron con los programas pClamp 11 (Molecular Devices), SigmaPlot (Systat Software) y R v 4.1.0 (R Core Team 2021).

Visualización de la expresión de proteínas usando microscopia de fluorescencia

Se confirmó la expresión de todas las proteínas quiméricas mediante la detección de la fluorescencia de la pHluorina, la cual se obtuvo con el uso de microscopia de epifluorescencia o confocal. En los dos casos, las células se observaron a las 24 o 48 horas después de la transfección. Arclight se expresó de manera óptima a las 24 horas mientras que las proteínas quiméricas con el msNHE_{VSD} lo hicieron hasta las 48 horas después de la transfección. Cuando usamos microscopia confocal, las células se cultivaron, transfectaron y se observaron en placas con fondo de vidrio (Cat. FD35-100 de FluoroDish); la longitud de onda de excitación fue de 488 nm con una amplificación de 60x (A.N. 1.1) en un microscopio confocal invertido Olympus IX81 (las observaciones se hicieron en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada del Instituto de Biotecnología). Durante los experimentos de electrofisiología se usó microscopía de epifluorescencia para seleccionar las células transfectadas; después de la transfección, las células se despegaron de las placas usando tripsina (TrypLE Express Enzyme (1X) Cat.12604-54 de Gibco), se colocaron en pequeños fragmentos de cristal (que se obtuvieron de cubreobjetos Premium Cover Glass Cat. 12-548-5J de Fisher Scientific) y se observaron en el microscopio.

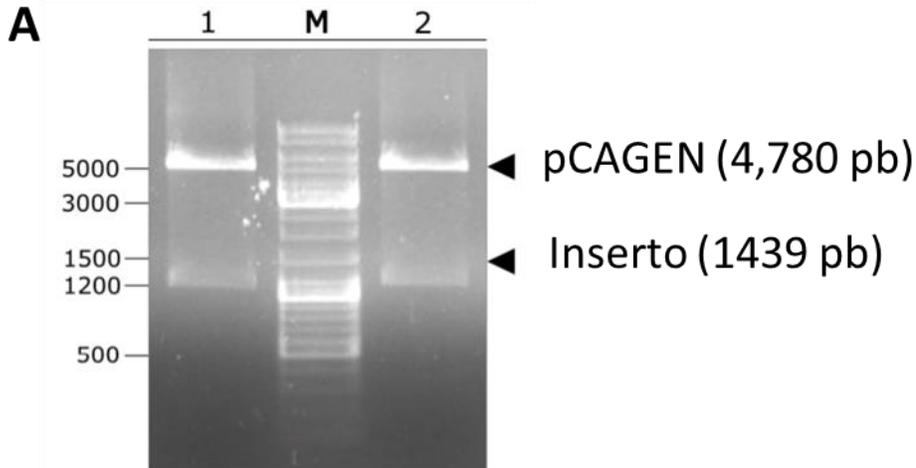
Resultados

Clonación del msNHE_{VSD}

En 2003 se reportó que el intercambiador sNHE de ratón es una proteína de membrana esencial para los espermatozoides (Wang et al., 2003). Sin embargo, el análisis de sus propiedades biofísicas no ha progresado desde entonces, debido a la dificultad de expresarlo en un sistema heterólogo (Ver discusión; Wang et al., 2007). Como se expuso previamente, solamente la proteína ortóloga de erizo de mar está caracterizada (Windler et al., 2018). Aun así, hay experimentos realizados en espermatozoides de ratón en los que se evidencia indirectamente su funcionamiento (Chávez et al. 2014; Hernández-Garduño, Chavez, et al. 2022).

En este estudio, decidimos caracterizar el VSD del sNHE de ratón (msNHE_{VSD}) aprovechando su naturaleza modular (Okamura & Okochi, 2019). De acuerdo con reportes previos (Arrigoni et al. 2013; Jin et al. 2012), el VSD mantiene su funcionalidad cuando se aísla de su proteína original y se une a otros dominios. Tomando en cuenta esta propiedad, diseñamos dos proteínas quiméricas del msNHE_{VSD}, la primera con el dominio unido a Kcv-GFP (canal de K⁺ Kcv unido previamente a GFP) y la segunda con la unión a la proteína fluorescente pHluorina.

Después de hacer la unión del msNHE_{VSD} a Kcv-GFP (pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP), realizamos un patrón de digestión con los plásmidos obtenidos de diferentes colonias. En todos los casos obtuvimos un tamaño menor al esperado (Figura 10A). Mediante la secuenciación de los plásmidos, observamos que tenían una delección importante (aproximadamente 300 pb) en la región codificante para el msNHE_{VSD} (Figura 10B). Aunado a esto, observamos un número pequeño de colonias después de la transformación del vector ligado. Este resultado se repitió usando distintas cepas de *E. coli*: DH5 α , TOP10, JM109 y JM110 (no se incluyen los resultados de esta parte).



B

A.A. M V F T
Esp. AACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCACCATGGTCTTCACA 60
Obt. aacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcaccatggctttca-- 58

S1

A.A. N E F E Y T G Y L V V L M S T Y P M I I
Esp. AATGAATTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCCTATGATAATC 120
Obt. ----- 58

S2

A.A. C W I S R L K D I Y D N E I K C A N Y Y
Esp. TGTTGGATTTCCCGACTAAAAGACATCTATGACAACGAGATAAAATGTGCTAACTACTAT 180
Obt. ----- 58

A.A. F L A F Y I L E A L L K V A A M R K E F
Esp. TTTCTTGCCTTCTATATTCTAGAGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGAAGGAATTT 240
Obt. ----- 58

S3

A.A. F S H T W L L F E L G I T L V G I L D I
Esp. TTTTCACACACCTGGCTCCTGTTTGAGCTGGGGATTACCTTAGTCGGCATCCTAGATATA 300
Obt. ----- 58

S4

A.A. I L I E T D S I S Y N F D L T E F V V F
Esp. ATACTTATCGAAACGACTCCATTAGTTACAATTTGACTTAACTGAGACTGTGGTCTTC 360
Obt. ----- 58

A.A. M N V I R L L R I L R I L K L V T P K
Esp. ATGAACGTGATTTCGACTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTTGTAACACCAAAAT 418
Obt. -caaacgtgatttcgactccttcgtatactgcgcatcttgaagcttgtaacaccaaata 115

Figura 10. Obtención de deleciones en el plásmido pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP. A) Patrón de electroforesis de pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP después de haberlo digerido con las enzimas de restricción EcoRI y NotI. Los carriles 1 y 2 corresponden a plásmidos de diferentes cultivos de bacterias, mientras que el carril M corresponde al marcador de peso molecular. B) Alineamiento de

la secuencia de ADN teórica (Esp.) y la obtenida después de la secuenciación del plásmido (Obt.). Además, se incluye en el alineamiento la secuencia de aminoácidos del msNHE_{VSD}.

Lo obtenido con la proteína quimérica pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP sugería que el canal de K⁺ fue una fuente de toxicidad en las bacterias transformadas. Dicha toxicidad podría haber generado una selección negativa de las colonias con un plásmido incompleto. Basándonos en esta idea, decidimos cambiar el canal de K⁺ Kcv por la proteína fluorescente pHluorina. Al igual que en reportes pasados, esta proteína podría servirnos también como un sensor de voltaje fluorescente (Jin et al. 2012). Para obtener la nueva construcción, primero realizamos la amplificación del dominio msNHE_{VSD} mediante PCR (Fig. 11A). Después, insertamos el VSD en lugar del sensor de voltaje de CiVSP y realizamos la confirmación mediante un patrón de digestión (Fig. 11B), con lo que obtuvimos pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina.

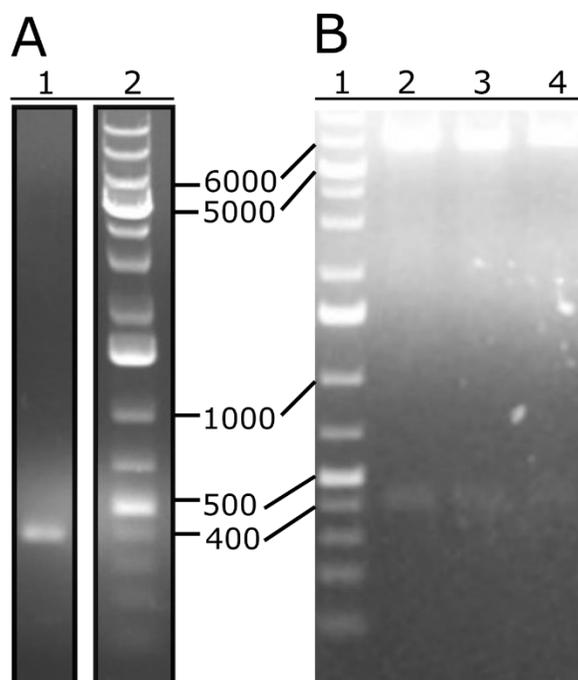


Figura 11. Preparación de pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina. Patrón de electroforesis de la amplificación por PCR del msNHE_{VSD} (A; carril 1; banda esperada: 399 pb) y del plásmido codificante para pCS2+

msNHE_{VSD}-pHluorina después de haber sido digerido con las enzimas BamHI y HindIII (B; carriles 2-4; banda esperada: 386 pb). En los carriles A2 y B1 se colocó el marcador de peso molecular.

En la primera preparación que hicimos de pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina, usando la cepa JM109 (DE3), obtuvimos una colonia cuyo plásmido tenía completa la región que codifica para el msNHE_{VSD} y la pHluorina (confirmado por secuenciación). Además, mediante el monitoreo de la emisión de la pHluorina usando microscopia de epifluorescencia, confirmamos la expresión en células HEK293. Sin embargo, la proteína no se ubicó de manera preferencial en la membrana plasmática como lo hizo Arclight (Figura 12B; proteína descrita en la figura 4B). Aunque no conocemos la causa de tal resultado, esta propiedad podría limitar hasta cierto punto, la actividad del VSD registrada en células HEK293.

Existen múltiples casos de VSDs que pueden formar poros permeables a ciertos iones (Arima et al. 2018; Zhao and Blunck 2016; Sutton et al. 2012). Tomando en cuenta los antecedentes, probamos la idea de que esto pudiera estar pasando al aislar el msNHE_{VSD} del resto de la proteína, como sucede con el canal de K⁺ Shaker (Zhao & Blunck, 2016). Para probar si era lo que estaba sucediendo, decidimos estudiar a las células HEK293 transfectadas con pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina usando electrofisiología convencional. Después de hacer los registros, logramos confirmar la presencia de una corriente iónica en dos células transfectadas con el plásmido pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina (Figura 13). No pudimos aumentar el número de repeticiones para estos registros debido a la imposibilidad de obtener nuevo plásmido con la secuencia completa de msNHE_{VSD}. Aun así, este resultado sugiere fuertemente la presencia de un poro inducido por la expresión de msNHE_{VSD}.

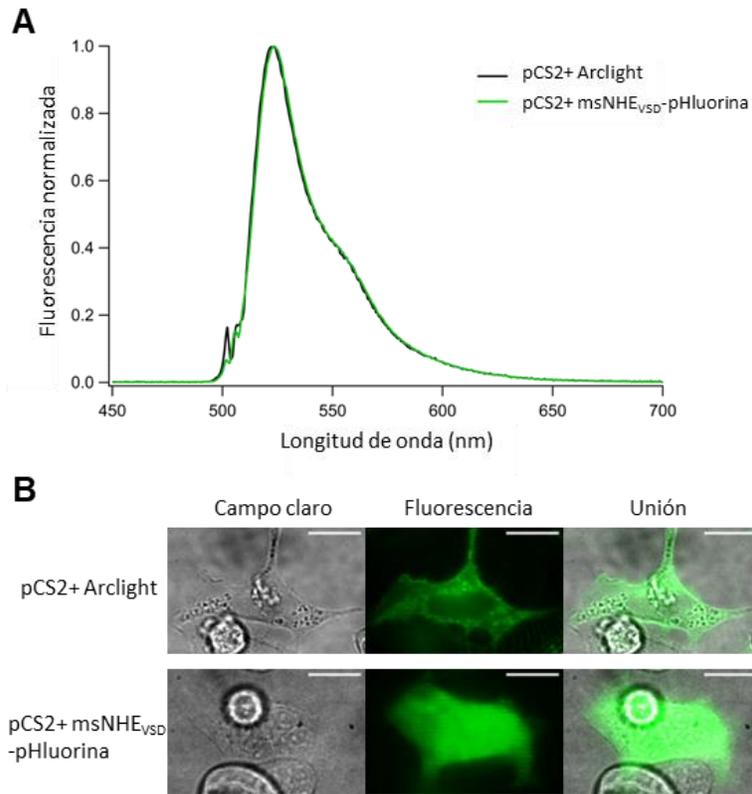


Figura 12. Expresión de la proteína quimérica pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina en células HEK293. A) Espectro de emisión de dos células HEK293 transfectadas con pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina (trazo verde) o pCS2+ Arclight (trazo negro). B) Imágenes de microscopía confocal de células HEK293 transfectadas con pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina (abajo) o pCS2+ Arclight (arriba). Por encima de cada imagen se especifica si corresponde a campo claro, fluorescencia o la sobreposición de las dos anteriores.

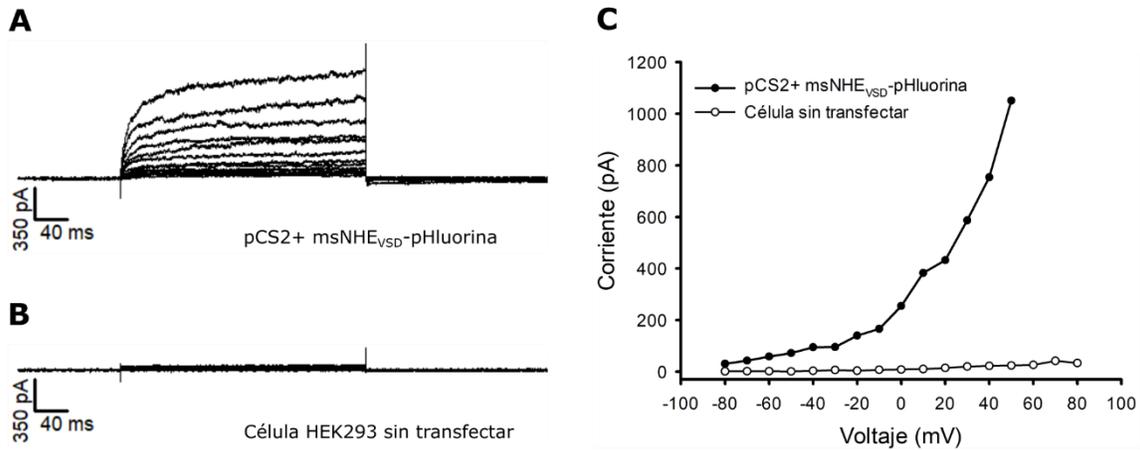


Figura 13. Registro de corrientes preliminares con la proteína quimérica pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina. Registros representativos de la corriente iónica de una célula no transfectada (B) o transfectada con el plásmido pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina (A). Se usó un protocolo de pulsos cuadrados de -80 a 80 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -120 mV. C) Curvas IV (corriente-voltaje) de los registros que se muestran en A y B.

Posteriormente quisimos repetir tal experimento, pero el plásmido purificado se terminó y aunque lo intentamos, no logramos amplificarlo correctamente después de transformarlo en bacterias. Intentamos volver a preparar el plásmido usando el mismo procedimiento y la cepa *E. coli* JM109 (DE3) que fue usada previamente, pero en todos los casos obtuvimos plásmidos con la secuencia del msNHE_{VSD} incompleta. Este resultado fue muy similar al obtenido con la proteína quimérica pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP. Incluso el uso de otras cepas de *E. coli* (TOP10, JM110 y DH5 α), la incubación a temperaturas bajas (aun a temperatura ambiente) o el uso de otros vectores (pJET1.2) (datos no incluidos), nos dieron el mismo resultado. Por lo tanto, concluimos que los problemas durante la preparación de nuestra construcción se debieron probablemente a un efecto tóxico del msNHE_{VSD} en *E. coli*. Para resolver el problema, decidimos probar el uso de dos estrategias diferentes que nos permitieran evitar la expresión de la proteína completa en *E. coli*. Esto con la idea de eliminar el efecto tóxico del msNHE_{VSD}, que nos permitiera obtener el plásmido completo para continuar con su estudio en células eucariotas.

Inserción y posterior supresión de un codón de paro ambar

Para eliminar la toxicidad del msNHE_{VSD} en bacterias, usamos en primer lugar el sistema de supresión de codones ambar. En nuestro caso, empleamos el plásmido pMAH-MYRS (Figura 14) que codifica para el par ortogonal compuesto por la 3-nitrotirosina aminoacil ARNt sintetasa y varios ARNts que eficientemente suprimen el codón de paro ambar. En su lugar, insertan eficientemente una tirosina o el aminoácido no natural Nitro-tirosina. El plásmido pMAH ya había sido descrito previamente (Chatterjee et al. 2013) y la aminoacil ARNt sintetasa solo difiere de la silvestre en dos aminoácidos particulares (Y37L y Q195S) (Figura 14). Para poder hacer uso del sistema previamente descrito, introdujimos un codón de paro ambar en la posición Y665 del msNHE_{VSD} (VSD_{Y665Amb}) mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR. Esto nos permitiría evitar la expresión de la proteína completa en bacterias (produciéndose una proteína truncada de 92 aminoácidos), donde la supresión de codones de paro ambar está ausente (Figura 15A). Después de transformar la proteína quimérica mutada, pudimos obtener efectivamente el plásmido ligado en *E. coli* sin ningún problema (Figura 15B). Dicho plásmido contiene la secuencia completa que codifica para VSD_{Y665Amb} (pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina) sin ninguna mutación no deseada.

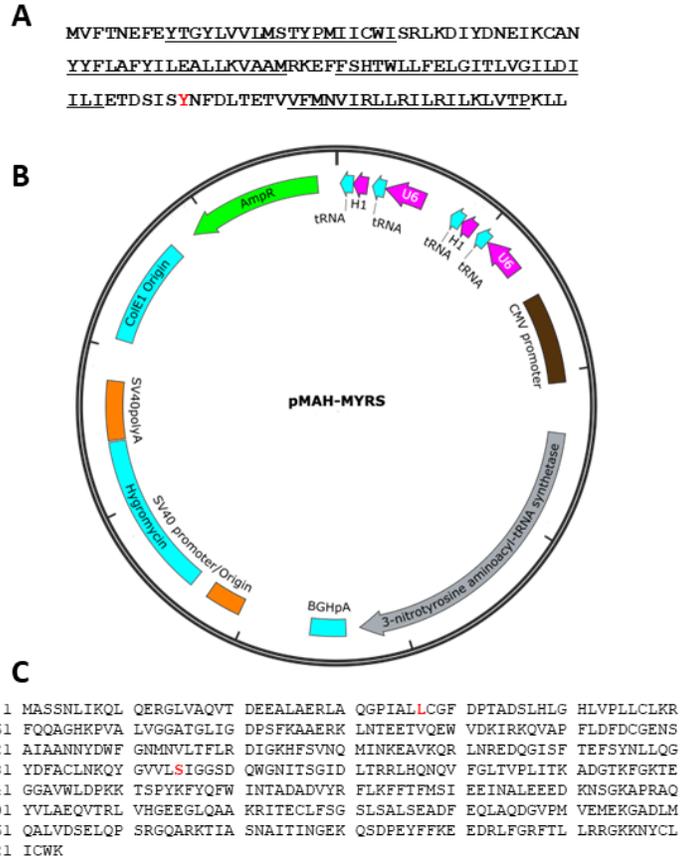


Figura 14. Secuencia del msNHE_{VSD} y pMAH MYRS. A) Secuencia de aminoácidos del msNHE_{VSD}. Las partes subrayadas corresponden a los segmentos transmembranales del dominio. La tirosina 665 que se mutó a codón de paro ambar está en rojo. B) Mapa del plásmido pMAH MYRS. Se indica la ubicación de la 3-nitrotirosina aminoacil-ARNt sintetasa, de las cuatro copias del ARNt correspondiente y de los demás elementos del plásmido. C) Secuencia de aminoácidos de la ARNt sintetasa. La enzima tiene solo dos modificaciones con respecto a la silvestre, las cuales están en rojo (Y37L/Q195S).

anterior, cuando las células HEK293 son transfectadas solamente con pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina obtuvimos una fluorescencia de mucho menor intensidad en menos del 2% de las células (Figura 15C). Esto indica que con nuestro sistema pudimos suprimir correctamente el codón de paro.

Realizamos registros electrofisiológicos, para confirmar si la corriente previamente obtenida era reproducible en células HEK293 expresando pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina. Como lo anticipamos, registramos una corriente saliente dependiente de voltaje en las células HEK293 co-transfectadas con pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina y pMAH-MYRS (Figura 16A). Como control, co-transfectamos células HEK293 con Arclight Q239 (el VSD de CiVSP fusionado a pHluorina) y pMAH-MYRS, pero en dichas células no detectamos ninguna corriente iónica (Figura 16B). En este último caso solo registramos la corriente de compuerta del VSD, lo que confirma la correcta expresión de la proteína (Figura 16C).

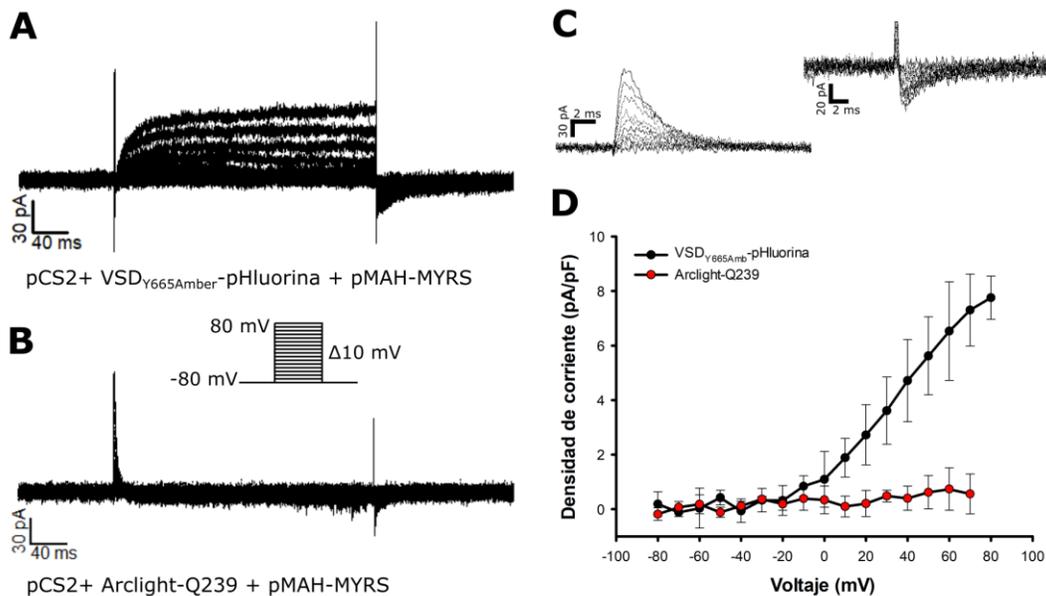


Figura 16. Corriente iónica a través de pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina. Registros representativos de la corriente iónica de células HEK293 co-transfectadas con pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina y pMAH-MYRS (A) o con pCS2+ Arclight-Q239 y pMAH-MYRS (B). En los dos casos se usó un protocolo de pulsos cuadrados de -80 a 80 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. C) Acercamiento a la parte inicial (izquierda) y final (derecha) del registro que se muestra en B. La primera parte

corresponde a la activación del VSD a potenciales depolarizantes, mientras que la segunda parte corresponde al regreso del VSD a su posición original. D) Curvas IV (corriente-voltaje) de los registros que se muestran en A y B). Se grafica el promedio \pm SD (n=5).

Inserción de un intrón

La supresión del codón de paro ambar fue exitosa después de co-transfectar pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina y pMAH-MYRS. Sin embargo, las células estaban frágiles y no tenían un estado apropiado para la realización de registros de “Whole cell Patch clamp”. Por lo tanto, como segunda estrategia probamos la inserción de un intrón en el ADN codificante para el VSD. Para hacer esto, escogimos un intrón sintético pequeño (133 pb) que previamente se usó para la selección de drogas mediante *splicing* (Younis et al., 2010). El intrón contiene por lo menos un codón de paro en cualquier marco de lectura. Su inserción, por lo tanto, resulta en la producción de una proteína truncada en cualquier posición del gen. En células eucariotas el intrón es eliminado por medio de *splicing*. En nuestro caso, insertamos el intrón a la mitad del ADN codificante para el msNHE_{VSD} (Figura 17A). Para hacerlo, amplificamos mediante PCR el intrón y el VSD en dos partes (Figura 17B y C). Después se unieron los tres fragmentos y se ligó el producto final en el vector pCS2+ para unirlo a pHluorina.

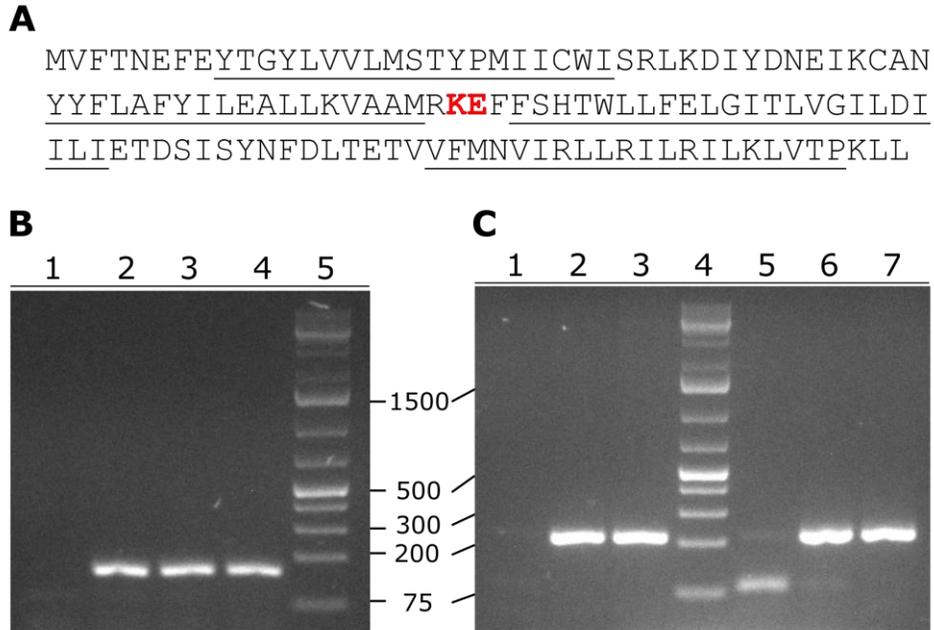


Figura 17. Amplificación de los fragmentos de ADN para la preparación de pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina. A) Secuencia de aminoácidos del msNHE_{VSD}. Las partes subrayadas corresponden a los segmentos transmembranales del dominio. La región donde se insertó el intrón quimérico está en rojo. B y C) Patrón de electroforesis de la amplificación por PCR del intrón quimérico (B, carriles 2-4; banda esperada: 152 pb) y de las dos partes del msNHE_{VSD} (C, carriles 2-3 y 6-7. Bandas esperadas: 214 y 216 pb respectivamente). Los carriles B1 y C1 son controles de los PCRs sin templado. Los carriles B5 y C4 contienen el marcador de peso molecular.

En teoría, las bacterias transformadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina producen un VSD truncado de 70 aminoácidos con un C-terminal de 9 aminoácidos no relacionados en lugar de los 126 originales (Figura 18A). De acuerdo con lo esperado, una vez que se insertó el intrón, pudimos preparar la nueva construcción sin obtener modificaciones a la secuencia codificante (Figura 18B). Al igual que lo observado con VSD_{Y665Amb}-pHluorina, este resultado apoya la idea de que la expresión del msNHE_{VSD} resulta ser tóxica para las bacterias.

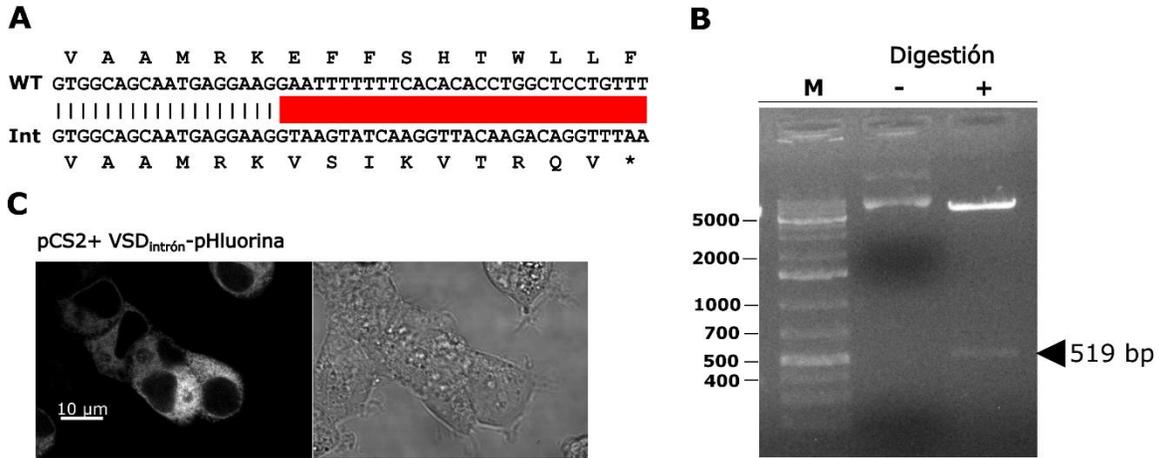


Figura 18. Obtención y expresión en un sistema heterólogo de pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina. A) Alineamiento de secuencias parciales (ADN y aminoácidos) del msNHE_{VSD}, las del gen silvestre están en la parte de arriba y con la inserción del intrón en la parte de abajo. La banda roja indica la región donde se modificaron 9 aminoácidos debido a la inserción del intrón antes de la aparición de un codón de paro. B) Patrón de electroforesis después de haber digerido pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El carril M corresponde al marcador de peso molecular mientras que los siguientes corresponden al ADN sin digerir (-) o digerido (+). La flecha negra indica la posición y el tamaño de la banda esperada después de la digestión. C) Imágenes de microscopia confocal de células HEK293 transfectadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina.

En células HEK293, la proteína quimérica con el msNHE_{VSD} fusionado a pHluorina se expresó de manera más eficiente después de transfectar el plásmido pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina (46% de células transfectadas) en comparación con la construcción pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina (34% de células transfectadas) (Figura 18C). Además, las células estuvieron expuestas a un menor nivel de estrés y estaban relativamente más sanas, lo que ayudó a tener un mayor éxito en la realización de los registros electrofisiológicos. Por lo tanto, la caracterización de la corriente iónica del msNHE_{VSD} se realizó mediante la expresión de la construcción que contiene el intrón. Sin embargo, las células HEK293 transfectadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina siguen siendo relativamente más frágiles que las transfectadas con Arclight Q239 (pCS2+ VSD_{CIVSP}-pHluorina), lo que sugiere que el msNHE_{VSD} también es tóxico en células eucarióticas, no solamente en *E. coli*. Otra posible explicación es que el daño en las células

HEK293 sea causado por la alta sobre expresión de msNHE_{VSD}-pHluorina en comparación de otras proteínas como Arclight.

Caracterización de la corriente iónica producida por el msNHE_{VSD}

En células HEK293 transfectadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina, observamos una corriente saliente dependiente de voltaje (Figura 19A); la corriente fue similar a la registrada con pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina y pMAH-MYRS. Esta corriente no se modificó por la sustitución de K⁺ por NMDG⁺ en la solución interna (datos preliminares no incluidos). Por lo tanto, en un inicio consideramos que la corriente podría ser acarreada por H⁺ o Cl⁻.

Para determinar que ion es el permeante a través del VSD, hicimos nuevos registros electrofisiológicos después de modificar el gradiente de H⁺ entre el interior y exterior de las células HEK293. Si la corriente iónica registrada fuera por los protones que cruzan por el sNHE, la curva IV tendría un corrimiento hacia valores de voltaje más negativos (hiperpolarizantes) al disminuir el pH_i. Por lo tanto, disminuimos el pH de la solución interna de 7.4 a 6.4. Después de realizar los registros electrofisiológicos, observamos que la cinética de activación parece ser más lenta a pH 6.4 (Figura 19B). Sin embargo, la dependencia al voltaje de la corriente no se vio afectada (Figura 19D), lo que sugiere que los protones no son el ion que permea a través del VSD. El siguiente paso fue registrar la corriente iónica después de modificar el gradiente de Cl⁻. Para esto, disminuimos la concentración de Cl⁻ en la solución externa mediante la sustitución del NaCl por metanosulfonato de Na⁺ (cambiando la concentración de Cl⁻ externo de 148 a 13 mM). En este medio con baja concentración de Cl⁻, no registramos alguna corriente saliente dependiente de voltaje en las células transfectadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina (Figura 19C). Hasta ese momento, dicho resultado sugería que el Cl⁻ era el ion permeante a través del msNHE_{VSD} y/o que la presencia de Cl⁻ externo (en un rango indeterminado de concentraciones arriba de 13 mM) es indispensable para poder adquirir la corriente a través del msNHE_{VSD}.

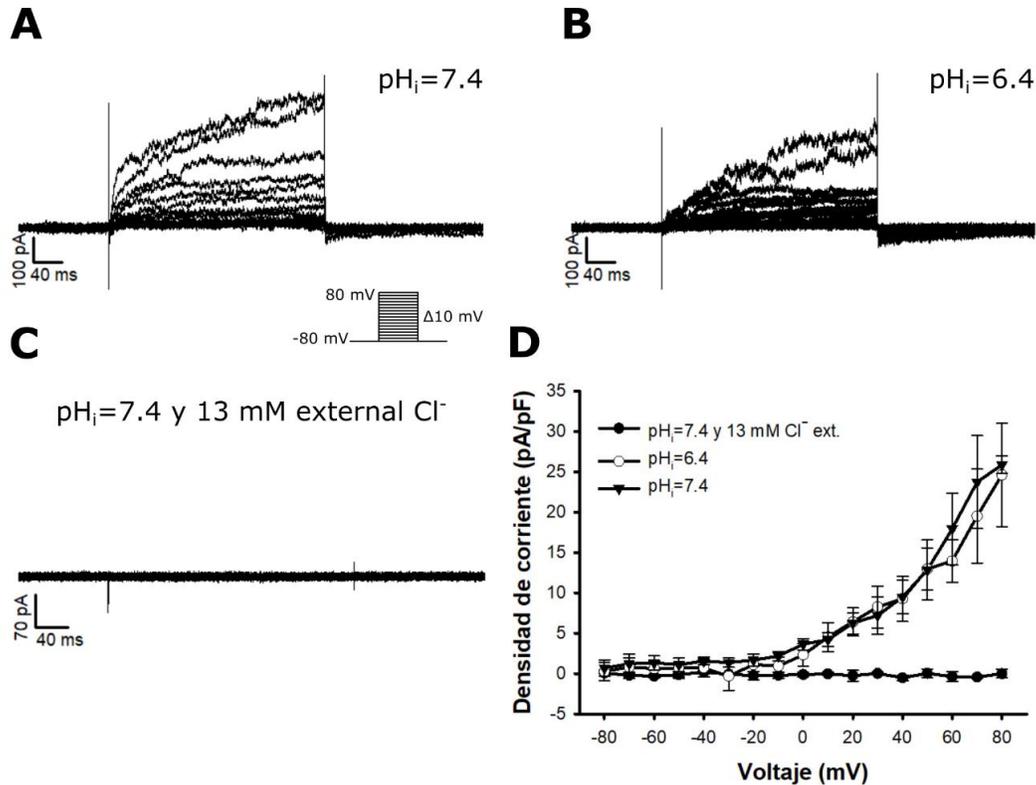


Figura 19. Registro de la corriente iónica de pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina en diferentes gradientes de H⁺ y Cl⁻. Registros representativos de la corriente iónica de células HEK293 transfectadas con pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina en diferentes condiciones: pH_i = 7.4 (A), 6.4 (B) y pH_i 7.4 con 13 mM de Cl⁻ externo (C). En todos los casos se usó un protocolo de pulsos cuadrados de -80 a 80 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. D) Curvas IV de varios registros como los que se muestran en A, B y C. Se grafica el promedio ± SD (n=5).

Determinación del potencial de inversión de la corriente iónica a través del msNHE_{VSD}.

Previamente registramos una corriente iónica a potenciales depolarizantes, la cual desapareció cuando disminuimos la concentración de Cl⁻ en la solución externa de 148 a 13 mM. Con base en esto, decidimos medir el potencial de inversión de la corriente iónica. Esto nos permitiría saber si el Cl⁻ era efectivamente el ion que permea a través del VSD o si la apertura del poro es dependiente de la alta concentración de este ion. Estos experimentos se realizaron con la proteína quimérica NtVSP-VSD_{intrón}-pHluorina (ExpSeq). Los detalles de su preparación se encuentran en la siguiente sección. Para medir el potencial de inversión,

usamos un protocolo para el registro de las corrientes de cola (con pulsos de -110 a 10 mV durante 50 ms) que van después del pulso de prueba (a 50 mV durante 300 ms) a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV (Figura 20A). El potencial de inversión obtenido mediante dichos registros fue de -30 ± 0.8 mV (Figura 20C), el cual es un valor considerablemente alejado del potencial de equilibrio calculado para el Cl^- en las condiciones iónicas usadas. Este resultado sugiere que el poro del VSD probablemente no es selectivo a algún ion en particular y que su apertura depende de la presencia de una alta concentración de Cl^- en la solución externa.

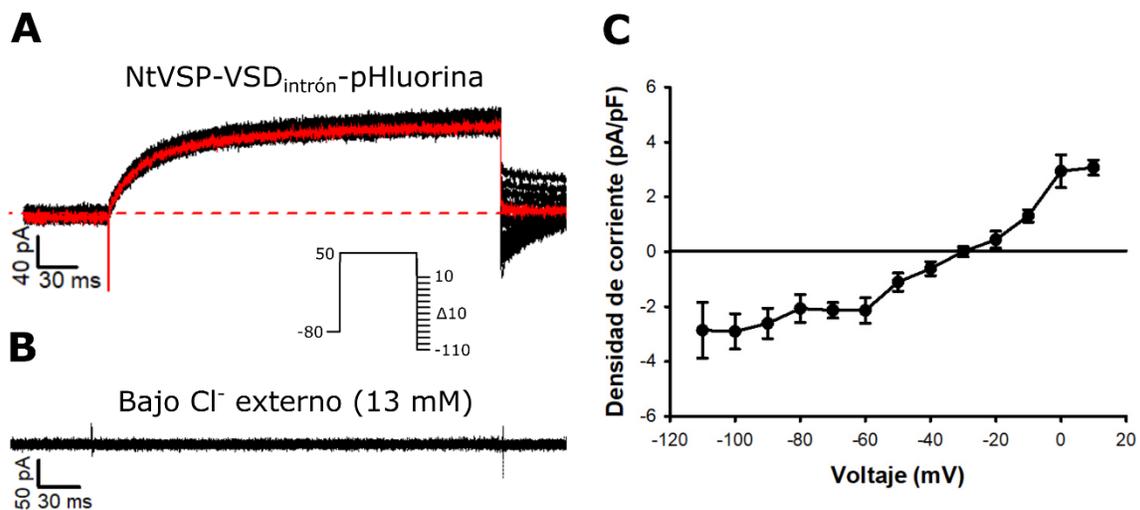


Figura 20. Obtención del potencial de inversión de la corriente iónica de la proteína quimérica NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq). A) Registro representativo de la corriente iónica de células HEK293 transfectadas con NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq). El trazo rojo corresponde a la corriente a -30 mV y la línea punteada roja indica el punto donde la corriente es cero. El protocolo de pulsos cuadrados se encuentra debajo del registro. B) Registro representativo de la corriente iónica de células HEK293 transfectadas con NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq) en una solución externa con baja concentración de Cl^- (13 mM). C) Curva de densidad de corriente – voltaje de varios registros como en A. Se graficó la corriente a los diferentes potenciales de membrana (-110 a 10 mV) que se probaron después del pulso de prueba de 50 mV. El potencial de inversión calculado fue de -30 ± 0.8 mV (n=5). Se grafica el promedio \pm SD (n=5).

Corriente de compuerta del msNHE_{VSD}

En los experimentos anteriores observamos corrientes iónicas salientes dependientes de voltaje en células transfectadas con las proteínas quiméricas del msNHE_{VSD}, lo que apoya la idea de que el dominio es funcional. Sin embargo, la corriente iónica se observa principalmente a potenciales de membrana positivos. Esto podría sugerir que la corriente de compuerta del VSD sucedería en dicho rango de voltaje, lo que iría en contra de lo esperado debido a que el espermatozoide de ratón se hiperpolariza durante la capacitación. Sin embargo, diversas corrientes de tipo omega pueden activarse en un rango de voltaje diferente al de la corriente de compuerta del sensor de voltaje (Moreau et al., 2014b). Debido a esto, decidimos registrar la corriente de compuerta del msNHE_{VSD} y comparar su dependencia al voltaje con la del VSD de la proteína de erizo de mar, debido a que es la única reportada hasta el momento y a que también se activa por hiperpolarización. Para poder medir la corriente de compuerta del msNHE_{VSD}, se requiere que haya una alta expresión del dominio en la membrana plasmática. Por lo tanto, decidimos hacer modificaciones a la proteína quimérica pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina con la intención de mejorar su expresión y ubicación en la membrana plasmática. Para ello modificamos los extremos amino y carboxilo de la construcción pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina. Agregamos el extremo amino de la fosfatasa dependiente de voltaje de *Ciona intestinalis* (NtVSP) (Arima et al., 2018) y las secuencias de exportación del canal Kir2.1 (Hofherr et al., 2005). Mediante distintas reacciones de PCR, amplificamos las tres regiones de la nueva proteína quimérica (NtVSP, VSD_{intrón} y pHluorina) para añadir las secuencias de exportación del Kir2.1 (Figura 21A y B). Al final se obtuvo la construcción NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq) (Figura 21C y 23A). Después de obtener el plásmido codificante, la expresamos en células HEK293, donde nuevamente registramos corrientes iónicas a potenciales de membrana depolarizantes (Figura 22). Además, el uso de una solución con baja concentración de Cl⁻ externo (13 mM), nos permitió registrar corrientes transitorias a potenciales hiperpolarizantes (Figura 23). Dichas corrientes son presumiblemente de compuerta, debido a que tuvieron una dependencia al voltaje similar a la reportada para la proteína ortóloga de erizo de mar

(Windler et al. 2018) (Figura 23D). Este resultado sugiere fuertemente que el segmento S4 del msNHE_{VSD} se mueve en dirección al interior de la célula a lo ancho de la membrana plasmática a potenciales de membrana hiperpolarizantes. Así mismo, muestra que la corriente iónica dependiente de Cl⁻ externo no se activa como la mayoría de los canales iónicos, cuyo poro se abre de acuerdo con el movimiento del VSD. En este caso, la corriente iónica registrada probablemente se activa igual que las corrientes omegas de diversos VSDs, en las que el poro estará abierto solo en determinada posición del dominio (Moreau et al., 2014a).

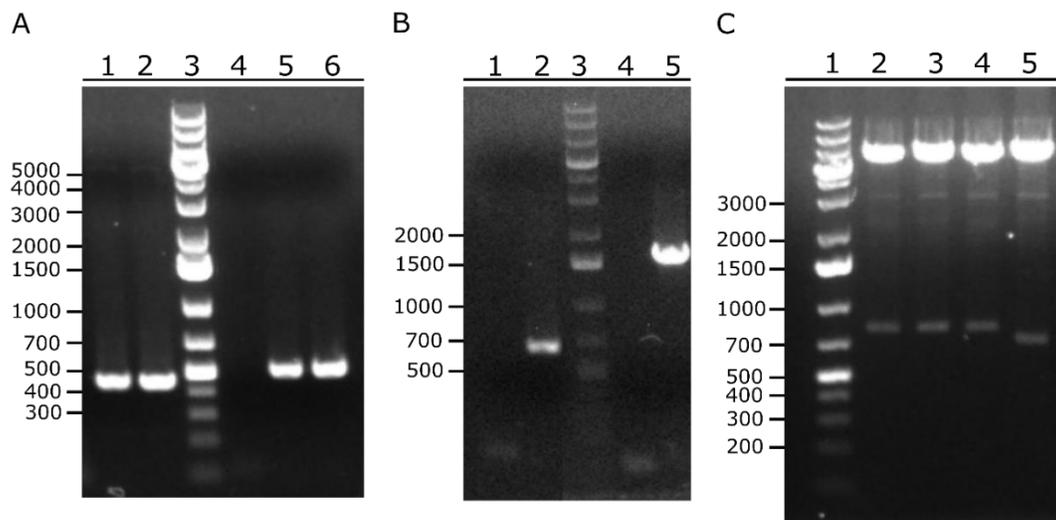


Figura 21. Obtención y expresión en un sistema heterólogo de NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq).

A) Amplificación del fragmento N-terminal de CiVSP (junto con la primera parte de la secuencia de exporte del Golgi; carriles 1 y 2, banda esperada: 459 pb) y de VSD_{intrón} (junto con la segunda parte de la secuencia de exporte del Golgi; carriles 5 y 6, banda esperada: 516 pb). B) Amplificación de fragmentos codificantes para la parte final de la proteína fluorescente y una región 3' del plásmido pCS2+ y para otra región correspondiente a la mayor parte de la pHluorina (carriles 2 y 5 respectivamente, bandas esperadas: 642 y 1691 pb respectivamente). Con estas amplificaciones se insertó la secuencia de exporte del retículo endoplásmico. C) Confirmación de la obtención de la proteína quimérica NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq) mediante la digestión (con las enzimas BamHI y HindIII) de varios ADNs plasmídicos de diferentes colonias de bacterias (los carriles 2-4 contienen ADNs positivos para NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq), banda esperada: 796 pb).

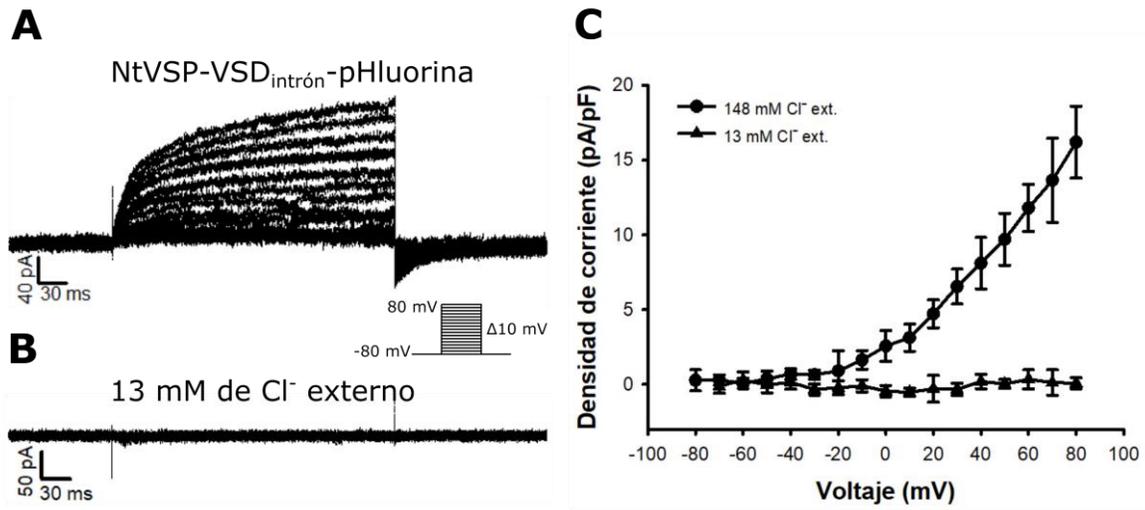


Figura 22. Registro de la corriente iónica de la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq). Registros representativos de la corriente iónica de células HEK293 transfectadas con pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq) en presencia de 148 (A) o 13 mM (B) de Cl⁻ en la solución externa. En todos los casos se usó un protocolo de pulsos cuadrados de -80 a 80 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. C) Curva IV para varios registros como los que se muestran en A y B. Se grafica el promedio ± SD (n=5).

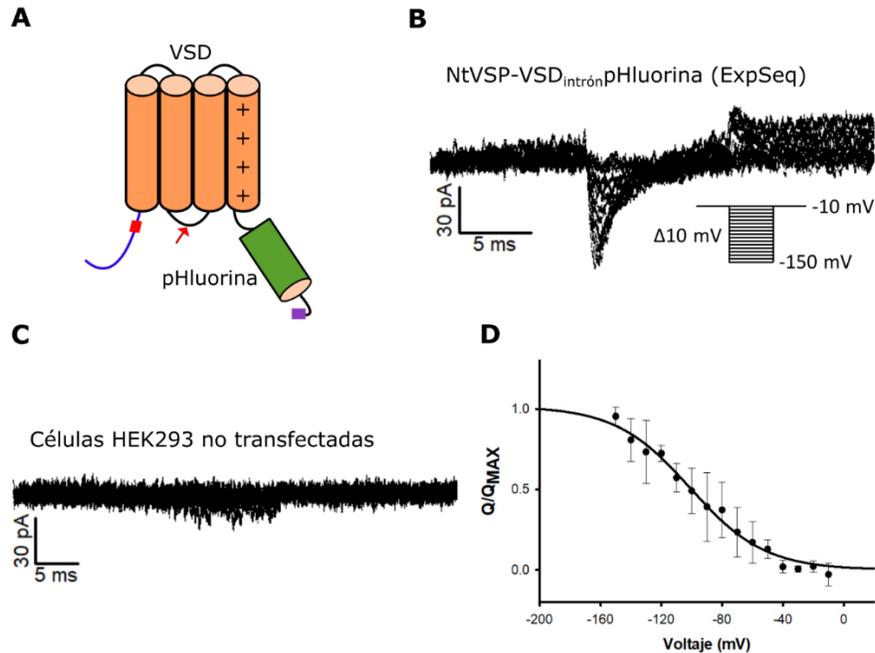


Figura 23. Registro de corrientes de compuerta de NtVSP-VSD_{intron}-pHluorina (ExpSeq). A) Esquema de la proteína quimérica utilizada para el registro de corrientes de compuerta. La línea azul corresponde a la región amino terminal de CiVSP mientras que la flecha roja señala la posición en la que se insertó el intrón quimérico. Las cajas roja y morada corresponden a las regiones donde se insertaron las secuencias de exporte del Golgi y del retículo endoplásmico, respectivamente. B) Registro representativo de la corriente de compuerta de las células HEK293 transfectadas con pCS2+ NtVSP-VSD_{intron}-pHluorina. Debajo del registro está el protocolo de pulsos cuadrados con el cual se obtuvieron las corrientes. C) Registro representativo de la corriente registrada en células HEK293 sin transfectar. Se usó el mismo protocolo que en B. D) Curva de movimiento de carga (Q) sobre la carga máxima (Q_{MAX}) en relación con el voltaje para varios registros como el que se muestra en B. Se grafica el promedio ± SD (n=4).

Comparación de la densidad de corriente de las proteínas quiméricas del msNHE_{VSD}

Una vez que registramos la corriente de compuerta del msNHE_{VSD} con la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intron}-pHluorina (ExpSeq), decidimos comparar la densidad de la corriente iónica entre todas las proteínas quiméricas usadas (Figura 24). De acuerdo con lo esperado, la corriente iónica fue mayor en la proteína quimérica con el intrón que en la que tiene la mutación Y665Ambar. Sin embargo, la corriente iónica de la proteína pCS2+ NtVSP-

VSD_{intrón}-pHluorina (ExpSeq) no fue significativamente diferente de la que solo tiene el intrón. Por lo tanto, es posible que el éxito en el registro de la corriente de compuerta no se deba a una mayor expresión de la proteína, sino a una modificación estructural en el VSD que facilita su detección. Es posible que, en la proteína quimérica más compleja, se mantenga la conformación adecuada para el movimiento del sensor de voltaje, mientras que, con la proteína quimérica simple, esta función podría estar afectada.

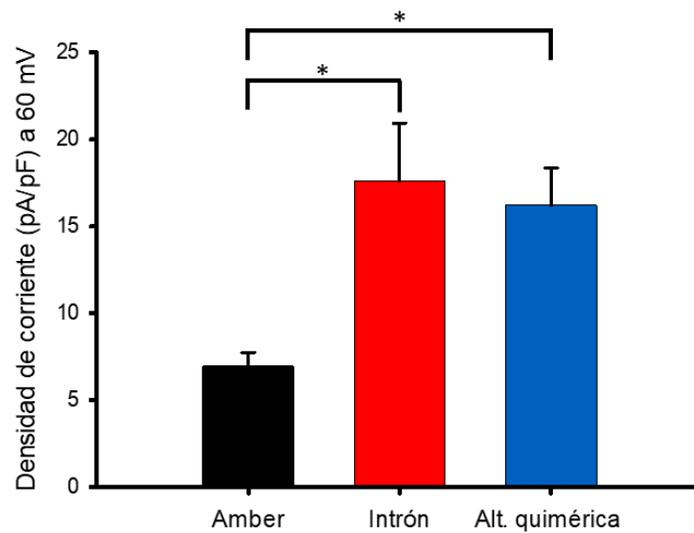


Figura 24. Densidad de corriente de las proteínas quiméricas con el msNHE_{VSD}. Comparación de la densidad de corriente de las tres proteínas quiméricas que se expresaron en células HEK293. La densidad de corriente de la proteína quimérica con la mutación del codón de paro ambar es significativamente menor que la de las demás proteínas quiméricas. Las barras representan los promedios \pm SD de las mediciones. *P < 0.001 t-test. n=5.

Discusión

La existencia del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide (sNHE) se reportó en 2003, en un trabajo en el que además se comprobó que es una proteína esencial para la fertilidad de los ratones (Wang et al., 2003). Recientemente se reportó que el sNHE codificado por el gen ortólogo de humano también juega un rol esencial en la fertilidad masculina (Cavarocchi et al., 2021). Una característica importante del sNHE (codificado por el gen SLC9C) en comparación con otros NHEs (genes SLC9A y SLC9B) es la conservación de dos dominios regulatorios: 1) sensor de voltaje (VSD) y 2) de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). Aunque algunas plantas poseen NHEs con un posible dominio de CNBD, los NHEs con VSD (sNHEs) están presentes solo en metazoarios (con algunas excepciones particulares; Romero & Nishigaki, 2019). Por lo anterior, se considera que el VSD es un dominio regulatorio particular del sNHE. A pesar de la importancia del sNHE para los espermatozoides de mamífero, el estudio de sus propiedades biofísicas no ha avanzado debido a que no se ha podido lograr la expresión correcta de la proteína en un sistema heterólogo (Wang et al., 2007). Para superar esta limitación y poder estudiar las propiedades del dominio sensor de voltaje del sNHE, decidimos aislarlo y estudiarlo determinando la actividad de otros dominios que reportaran su actividad (Kcv y posteriormente pFluorina). La hipótesis fue que su estudio mediante este tipo de estrategias nos permitiría determinar si el sNHE es sensible a los cambios del potencial de membrana (E_m) a diferencia de los demás NHEs (Romero & Nishigaki, 2019). Sin embargo, nos encontramos con diversos problemas al tratar de expresar en bacterias los vectores codificantes para el msNHE_{VSD}. Los problemas que enfrentamos se deben probablemente a un efecto tóxico del msNHE_{VSD}. Afortunadamente, el uso de dos estrategias distintas para prevenir la síntesis de la proteína completa en *E. coli*, permitieron la obtención correcta de las construcciones quiméricas. Con este avance en la clonación del dominio, pudimos registrar la corriente de compuerta del msNHE_{VSD}, lo que nos permite sugerir que participa como sensor de voltaje en la proteína completa.

Causas probables de la aparición de deleciones en el VSD

La primera construcción del msNHE_{VSD} que preparamos contenía el canal viral Kcv, por lo que fue lógico pensar que el paso desregulado de K⁺ por este canal fue la causa de la toxicidad en bacterias. Sin embargo, este efecto se mantuvo cuando se substituyó Kcv por la proteína fluorescente pHluorina, confirmando que la fuente de toxicidad era el msNHE_{VSD}. Por otro lado, este efecto del VSD no es extraño, debido a que, en varios casos, este dominio puede ser capaz de transportar iones (detallado más adelante), hecho que pudiera alterar la homeostasis iónica de las células. Además de este dominio, existen múltiples casos de proteínas transmembranales que causan toxicidad en bacterias o en otros sistemas heterólogos debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática. Un ejemplo es la proteína M2 del virus de influenza que al expresarse en ovocitos de *Xenopus*, se comporta como un canal iónico selectivo a cationes (Pinto et al., 1992). Además, hay trabajos que demuestran que la proteína 6K del virus Sindis y la proteína E del coronavirus SARS son tóxicas para *E. coli*. En los dos casos, la expresión de las dos proteínas en su respectivo sistema heterólogo afectó la permeabilidad de la membrana. Aunque la tasa de mutación en *E. coli* es muy baja ($\sim 10^{-7}$ mutación/gen/generación) (Drake et al., 1998), es posible que la muerte de las bacterias con la proteína completa permita que las células con alguna alteración se conviertan en la principal población en nuestros cultivos. Por esta razón por la cual solo se obtienen plásmidos con mutaciones y principalmente deleciones en msNHE_{VSD}. Estas alteraciones permiten el paso de iones y otras moléculas al citoplasma, lo que resulta en daño y muerte celular (Sanz, Pérez, and Carrasco 1994; Liao et al. 2004). Sin embargo, la toxicidad de estas proteínas no fue tan alta como la del msNHE_{VSD}, por lo que los genes se pudieron clonar en sus respectivos plásmidos sin la necesidad de usar métodos sofisticados o elaborados. Hasta la fecha, la razón del drástico efecto observado en *E. coli* en comparación con el efecto menor de las proteínas virales sigue siendo una interrogante. Una de las razones puede ser la diferencia en el número de copias de los vectores que se utilizaron en esos trabajos en comparación con los que nosotros usamos. Las proteínas virales se clonaron en plásmidos basados en el vector pET, el cual genera un bajo número de copias (15-20 copias/célula) (Rosenberg et al., 1987). Por otro lado, nosotros usamos

plásmidos (pCS2+ y pCAGEN) que producen un alto número de copias (300-500 copias/célula) y tienen el origen de replicación pUC (Vieira & Messing, 1982). Esto lo hicimos con la intención de preparar soluciones con una alta concentración de ADN que fuera suficiente para las transfecciones en las células HEK293. De manera interesante, obtuvimos el plásmido con la secuencia correcta la primera vez que preparamos pCS2+ msNHE_{VSD}-pHluorina. Dicha construcción se preparó en la cepa *E. coli* JM109 (DE3) y se expresó correctamente en células HEK293. Aunque no sabemos la razón concreta de ese resultado positivo, es posible que aquella población de *E. coli* haya sido inusualmente resistente a la toxicidad generada por el VSD.

Estrategias usadas para prevenir la toxicidad de un gen

Existen distintas estrategias para evitar la toxicidad de un gen cuando se expresa en *E. coli* (Saida et al., 2006): cambiar la temperatura durante el crecimiento de las bacterias, seleccionar promotores genéticos con diferentes características, etc. Un ejemplo de este tipo de proteínas tóxicas es CCH1, un canal de calcio que inicialmente fue imposible clonar en *E. coli*, debido a su alta toxicidad. En 2009, un grupo desarrolló una herramienta que permitió la clonación del gen de CCH1 en levaduras mediante el uso de una estrategia basada en recombinación homóloga (Vu et al., 2009). A pesar de que el sistema permitió la obtención correcta del plásmido deseado, se requiere del uso de levaduras (cuyo uso es menos común que el de *E. coli*) y la necesidad de preparaciones más complejas para la fusión *in vivo* de inserto y vector. Tomando esto en cuenta, consideramos que es importante establecer un método más rápido y eficiente que nos permita la expresión y caracterización de nuestra proteína tóxica. En ese sentido, las dos estrategias que usamos en el presente trabajo (la inserción de un codón de paro amber y la de un intrón quimérico) son adecuadas para este objetivo en nuestro modelo experimental.

Uso de la supresión del codón de paro ambar e inserción de un intrón para la preparación de plásmidos que codifiquen proteínas tóxicas para bacterias

En los últimos años se han hecho considerables aportes tecnológicos para expandir el código genético con la intención de poder incorporar aminoácidos no naturales (UAAs) en proteínas de interés. La inserción de UAAs con distintas propiedades presenta la oportunidad de estudiar a las proteínas mediante varias aproximaciones experimentales (Liu & Schultz, 2010). Hasta ahora se ha usado principalmente para el estudio de la localización intracelular y función de varias proteínas (Hyun et al. 2009; Kato 2019). La forma de incorporar UAAs en una posición específica es mediante la supresión de codones de paro ambar (Noren et al., 1989). Previamente se requería de la aminoacilación química de los ARNts (Roesser et al., 1986). Sin embargo, el uso de pares ortogonales de ARNts y ARNt sintetasas que insertan UAAs específicos, permitió simplificar el método (Young & Schultz, 2018). El hecho de que la inserción de los UAAs se realice en posiciones ocupadas por codones de paro permite que la proteína codificada se exprese incompleta en ausencia del sistema de supresión. Entonces, la sustitución del codón TAC que codifica tirosina por TAG (codón de paro ambar) permite evitar la expresión del msNHE_{VSD} completo en las cepas de bacterias que carezcan de tal sistema. Este punto es relevante para el proyecto porque es en *E. coli* donde el msNHE_{VSD} demostró ser altamente tóxico. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la inserción del codón de paro ambar permitió la preparación correcta del plásmido pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina sin mayores inconvenientes (Fig. 15). La supresión del codón de paro ambar en células HEK293 se logró mediante la co-transfección de pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina y pMAH-MYRS (plásmido que codifica para un par ortogonal de aminoacil ARNt sintetasa/ARNt (Fig. 14)). pMAH-MYRS se obtuvo durante el desarrollo de un sistema para la incorporación del UAA 3-nitro-L-tyrosine (3-NY) en células de mamífero (trabajo del grupo del Dr. Huiwang Ai; datos no publicados). Para la caracterización de este plásmido se usó una proteína GFP con la inserción de un codón de paro ambar que producía una proteína truncada. Se observó que la concentración de tirosina en el medio (rango mM) regula directamente el grado de expresión de la proteína completa en relación con la versión truncada (datos no publicados). En este proyecto fuimos capaces de reproducir lo

observado en células HEK293 con la proteína mutante de GFP, usando VSD_{Y665Amb}-pHluorina. Sin embargo, fue difícil la formación de sellos de alta resistencia en los experimentos de “*patch clamp*” en la configuración de célula completa. Esto sugiere que el sistema de supresión de codones de paro ambar genera afectaciones a las células. Lo anterior se debe probablemente a la supresión de codones de paro de proteínas endógenas, lo que resulta en la producción de proteínas con una secuencia distinta a la fisiológica. Aun así, la preparación de un plásmido con una mutación para producir un codón de paro es simple y no requiere de mucho tiempo. Con esta información, concluimos que la supresión de un codón de paro ambar, representa una opción novedosa y sencilla para superar la problemática de preparar un plásmido codificante para una proteína toxica en bacterias. Antes de nosotros, la supresión de codones de paro ambar se usó para la preparación de plásmidos codificantes para las proteínas toxicas Ndd (bacteriófago T4) y barnasa (ARNasa de bacterias) (Bouet et al. 1996; Betzner, Oakes, and Huttner 1997). Esos reportes buscaron controlar la expresión de una proteína ya conocida, por lo que nuestro trabajo pretende promover una alternativa para el estudio de las propiedades de proteínas no caracterizadas.

Subsiguiente a la inserción del codón de paro y su supresión, probamos la inserción de un intrón en el msNHE_{VSD}. Varias proteínas virales son toxicas en bacteria, por lo que existen varios trabajos en los que hubo muchos problemas en la preparación de vectores de expresión que las codificaran. En 1996 se usó por primera vez la inserción de un intrón para la preparación de un plásmido codificante para Potyvirus (Johansen, 1996). Posteriormente, esa misma estrategia se usó para la clonación de proteínas de distintos virus, entre ellos el coronavirus TGEV (González et al., 2002; Guo et al., 2020; López-Moya & García, 2000). En nuestro trabajo, proponemos la inserción de un intrón como un método para el estudio de otros tipos de proteínas toxicas que no sean virales. Tomando en cuenta estos antecedentes preparamos pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina e hicimos registros de “*patch-clamp*” en células HEK293. En este caso, la preparación del plásmido es un poco más laboriosa que la necesaria para la mutación a un codón de paro ambar. Sin embargo, las células transfectadas con este plásmido resultaron estar en un mejor estado general, lo que propicio una mayor eficiencia en la realización de sellos para los registros de “*patch-clamp*”. Esto se debe probablemente

a que con este método no se requiere de una alta concentración de tirosina en el medio ni del uso del par ARNt/ARNt sintetasa, que podría estar suprimiendo codones de paro de proteínas endógenas. Además, la estrategia de inserción del intrón presenta una ventaja adicional, ya que el proceso de “*splicing*” de proteínas recombinantes mejora sus niveles de expresión. Esto sucede probablemente por la acumulación de ARN mensajero (ARNm) (Nott, Meislin, and Moore 2003; Gallegos and Rose 2015), aunque en general no es un proceso completamente entendido. El aumento de la expresión de la proteína quimérica se reflejó en corrientes iónicas de una densidad más alta que la de las corrientes obtenidas con la mutante del codón ambar ($P < 0.001$ *t*-test). A pesar de las ventajas en relación con la supresión del codón ambar, los registros electrofisiológicos fueron también más difíciles de realizar en comparación con Arlight Q239 (pCS2+ VSD_{CIVSP}-pHluorina). Esto sugiere que el dominio es tóxico también en células eucariotas, sin embargo, otros factores también podrían estar influyendo en la falta de éxito de los experimentos. Entre estos factores podría estar la cantidad de agente transfectante (jetPEI) y el alto nivel de sobre expresión necesario para poder registrar la actividad del msNHE_{VSD}. Aun así, la toxicidad aparente en las células HEK293 no se ve reflejada en una menor viabilidad celular (resultados preliminares), por lo que la afectación a las células podría no estar teniendo un efecto tan drástico. En los casos en los que se utilicen proteínas cuya toxicidad sea solo en bacterias, las dos estrategias de clonación deberían de funcionar con menores diferencias entre ellas. En el futuro, se requiere de una acumulación de datos para realizar una evaluación adecuada de los métodos que proponemos.

Corriente iónica a través del msNHE_{VSD} y otras proteínas

Desde los años 90 se ha estado acumulando evidencia de que diversos VSDs son capaces de acarrear corrientes iónicas de manera natural o en casos donde se hagan mutaciones o modificaciones a la estructura general de la proteína. En un reporte reciente, se demostró que el VSD del canal HCN-like (HCNL) de pez cebra funciona como un canal iónico selectivo a protones que es activado por hiperpolarización (Wobig et al., 2020). De hecho, la mayoría de las corrientes iónicas reportadas a través del VSD son catiónicas: 1) Hv1 (selectiva a H⁺;

(Sasaki, Takagi, and Okamura 2006; Ramsey et al. 2006)), 2) en varios canales con mutaciones de S4 en el VSD (Starace and Bezanilla 2004; Tombola, Pathak, and Isacoff 2005), 3) en el VSD aislado del canal de K^+ Shaker (Zhao & Blunck, 2016), 4) en la subunidad Catsper3 de *C. intestinalis* y de ratón (selectiva a Ca^{2+} ; Arima et al. 2018). En este contexto, el $msNHE_{VSD}$ tendría una función novedosa; podría funcionar como un canal iónico no selectivo con cierta permeabilidad a Cl^- (por lo que sería el primer reporte de un VSD con una corriente aniónica) o como un canal no selectivo dependiente de Cl^- extracelular para la apertura del poro. Sin embargo, el potencial de inversión de la corriente iónica del $msNHE_{VSD}$ (-30 mV) está muy alejado del potencial de equilibrio del Cl^- en nuestras condiciones (-90.4 mV). Esto sugiere que la corriente es dependiente de una alta concentración de Cl^- externo. Aun así, el potencial de inversión que observamos es negativo (-30 mV). Este resultado apunta a que el poro de $msNHE_{VSD}$ podría ser más selectivo a Cl^- que a NMDG (el catión principal de la solución externa e interna, cuyo potencial de inversión sería cercano a 0 mV). Hasta donde pudimos investigar durante la escritura de este trabajo, solo existe un reporte en el que se observó que un VSD puede transportar aniones de manera selectiva. Esto sucede para el canal Hv1 de humano, en el que la mutación de Asp112 por otro aminoácido resultó en el cambio de selectividad de protones a aniones (específicamente OH^- y Cl^-) (Musset et al., 2011). En experimentos futuros se determinará de forma detallada la selectividad del $msNHE_{VSD}$ mediante la sustitución de los iones utilizados en las soluciones de registro. Otro aspecto que exploramos fue si el dominio $sNHE_{VSD}$ de otras especies era tóxico en bacterias debido a algún efecto similar al del sensor de voltaje de ratón. Por lo tanto, preparamos construcciones quiméricas de los dominios $sNHE_{VSD}$ de humano (NM_183061.3) y erizo de mar (*S. purpuratus*; NM_001098457.1), los cuales unimos a pHluorina. A diferencia de lo que observamos con el VSD de ratón, no tuvimos ningún problema para obtener los plásmidos codificantes para las proteínas quiméricas. En ninguno de los dos casos observamos alguna delección o mutación a la secuencia de los VSDs (Figura suplementaria 1). Además, cuando transfectamos el plásmido codificante para la proteína quimérica de humano (pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina), no registramos ninguna corriente iónica a diferencia de las células transfectadas con una

proteína quimérica con el msNHE_{VSD} (Figura suplementaria 2). Este resultado concuerda con la falta de toxicidad observada en bacterias e indica que los dominios de estas especies no tienen actividad de canal iónico. En conclusión, el msNHE_{VSD} es altamente tóxico en células procariotas (*E. coli*) y posiblemente en eucariotas (a falta de experimentos que lo confirmen en las células HEK293), posiblemente por su propiedad de conducir iones de manera no selectiva.

A pesar de que el msNHE_{VSD} expresado en células HEK293 muestra actividad similar a la de un canal iónico dependiente de voltaje, en espermatozoides de ratón no se han realizado experimentos que evidencien este tipo de corriente. Lo más probable es que la corriente iónica registrada sea un artefacto del aislamiento del VSD como se observa en algunos canales iónicos (Zhao & Blunck, 2016). Por ejemplo, el VSD aislado del canal de K⁺ Shaker produce una corriente catiónica no selectiva, que se activa a potenciales hiperpolarizantes (Zhao & Blunck, 2016), la cual no se observa en el canal completo.

Corriente de compuerta del msNHE_{VSD} y su dependencia al voltaje

Como se mencionó previamente, la corriente iónica registrada a través del msNHE_{VSD} se activa a potenciales depolarizantes a diferencia de la corriente de compuerta del sNHE_{VSD} de erizo de mar (Windler et al., 2018). Diversos reportes demuestran que es posible que la corriente de compuerta de un canal iónico tenga una dependencia al voltaje diferente al de la corriente iónica (Moreau et al., 2014a). Esto sucede normalmente cuando hay mutaciones en el S4 o al aislar el VSD del resto de la proteína, como en el caso del msNHE_{VSD}. Por lo tanto, decidimos obtener la corriente de compuerta del msNHE_{VSD} para poder compararla. Para lograrlo, modificamos sustancialmente tanto el extremo amino como el carboxilo del msNHE_{VSD} (Figura 23A). En teoría, estas modificaciones al msNHE_{VSD} permiten que tenga un mayor nivel de expresión en la membrana plasmática (Arima et al., 2018; Hofherr et al., 2005; Kwon et al., 2017). Con esta construcción hicimos registros electrofisiológicos para obtener las corrientes de compuerta. Las corrientes se activaron a potenciales de membrana hiperpolarizantes, con un potencial medio de activación ($V_{1/2}$) de

-101 ± 10 mV. El rango de voltaje en el que se activan es muy diferente al observado con las corrientes macroscópicas salientes, que se registraron a potenciales de membrana arriba de los 0 mV. Sin embargo, la dependencia al voltaje de las corrientes de compuerta del msNHE_{VSD} es similar a la del VSD del sNHE de erizo de mar ($V_{1/2}$: -95 ± 3 mV) (Windler et al., 2018). Esto sugiere que el mecanismo de regulación del sNHE por potencial de membrana está conservado en distintos grupos de organismos. Resultados de nuestro laboratorio respaldan lo observado con los registros de compuerta. En espermatozoides de ratón, la inducción (usando el ionóforo de K⁺ valinomicina) de la hiperpolarización del potencial de membrana provoca una alcalinización citosólica dependiente del sNHE (Hernández-Garduño, Chávez, et al., 2022). Estos resultados sugieren claramente que el VSD se acopla al dominio de intercambio iónico de una manera similar a lo que sucede con el canal HCN, otro canal activado por hiperpolarización (Männikkö et al., 2002). La observación de corrientes de compuerta sugiere que la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}-pHluorina (ExpSeq) mejora su expresión en la membrana plasmática. Sin embargo, de manera no esperada, la densidad de corriente iónica es similar a la de la quimera que solo tiene el intrón (Figura 24). Es posible que los fragmentos insertados (extremo amino de CiVSP y secuencias de exporte de Kv2.1) tengan un efecto en la cinética de activación de la corriente de compuerta, haciéndola más fácil de registrar. Con nuevas modificaciones al VSD podríamos confirmar tal hipótesis.

Lo obtenido en nuestros experimentos contrasta con la dificultad que se tuvo en investigaciones pasadas para estudiar al msNHE. Hasta ahora solo se había reportado la obtención de una proteína quimérica compuesta por los segmentos transmembranales 1 a 10 y 1 a 3 del msNHE y el NHE1 respectivamente (Wang et al., 2007). Sin embargo, dicha quimera no fue lo suficientemente activa como para ser estudiada. Además, mediante una comunicación personal con otro grupo de investigación, pudimos saber que la preparación de otro plásmido codificante para el msNHE no fue exitosa. Actualmente nuestro grupo de investigación ya cuenta con un plásmido codificante para el msNHE completo, sin embargo, esta construcción solo pudo obtenerse mediante la inserción de dos intrones en regiones

diferentes del marco de lectura. Esto es evidencia más clara de la toxicidad de la proteína y del porque no había sido estudiada con más detalle hasta ahora.

Posible relación funcional entre el sNHE y otras proteínas específicas del espermatozoide

Al entrar al tracto genital femenino, el espermatozoide se expone a una mucho mayor concentración de HCO_3^- (la cual pasa a estar de <5 mM a una concentración mayor de 25 mM) (Levine & Marsh, 1971). Este aumento en la concentración de HCO_3^- provoca un incremento intracelular de este ion debido a su entrada a través de un cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) (Demarco et al., 2003). Este hecho permite la activación de la sAC y marca el inicio del proceso de capacitación. Los ratones nulos para la sAC son infértiles y tanto su movilidad como otros parámetros asociados a la capacitación se ven afectados (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006). La importancia de esta enzima para la fisiología del espermatozoide está directamente relacionada con la actividad del sNHE. Desde el 2007 se observó que hay una codependencia en la expresión de la sAC y el sNHE para las proteínas de ratón (Wang et al., 2007). Además, en los metazoarios existe una relación evolutiva muy estrecha entre la sAC, el sNHE y el canal de Ca^{2+} Catsper, por lo que se propone que en este grupo formarían una maquinaria que regula el batido flagelar del espermatozoide (Romero & Nishigaki, 2019). Catsper es un canal específico del espermatozoide compuesto por diez subunidades conocidas, las cuales se ubican en cuatro columnas a lo largo de la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014). La ausencia de varias de sus subunidades en ratón resulta en espermatozoides con severos problemas de movilidad y por lo tanto en infertilidad (Qi et al., 2007).

Otra proteína importante para el espermatozoide es el canal selectivo a K^+ , Slo3⁺. La actividad de Slo3 provoca una hiperpolarización fisiológica de los espermatozoides de ratón durante la capacitación (Santi et al., 2010). Existe evidencia que relaciona directamente la actividad del sNHE y la de Catsper con la de Slo3. En 2014 se observó que la actividad de Catsper depende de la presencia en el espermatozoide de Slo3 (Chávez et al., 2014). En ese mismo reporte se propuso que Slo3 pudiera estar regulando indirectamente a Catsper

mediante la actividad del sNHE. Toda esta evidencia nos permite proponer una posible vía de señalización en la que el sNHE pudiera estar respondiendo a la hiperpolarización fisiológica causada por Slo3, causando un aumento del pH_i que activaría a Catsper (Figura 25). Esto resultaría en cambios fisiológicos importantes como la hiperactivación de la movilidad. En nuestro grupo de investigación también se observó el cambio del pH_i en respuesta a una hiperpolarización artificial. Este resultado junto con lo registrado en nuestro trabajo sobre la activación del $msNHE_{VSD}$ a potenciales de membrana hiperpolarizantes, nos permite reforzar la evidencia que apoya la existencia de la vía de señalización descrita previamente.

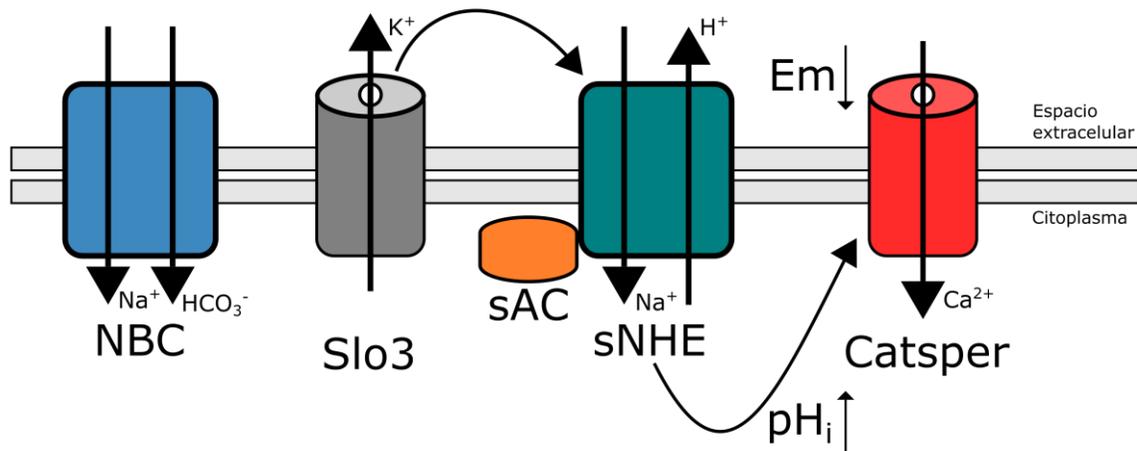


Figura 25. Modelo de la relación funcional entre algunas proteínas específicas del espermatozoide. Esquema de la relación funcional propuesta entre algunas proteínas específicas del espermatozoide. La sAC aumenta los niveles de AMPc y es activada por un aumento en la concentración de HCO_3^- generada por la actividad de transportadores como el NBC (cotransportador de Na^+ y HCO_3^-). El sNHE y la sAC se expresan de forma codependiente, además de que también podrían interactuar físicamente. La sensibilidad al voltaje del sNHE podría ser regulada por los niveles del AMPc como se vio en espermatozoides de erizo de mar. Además, el canal selectivo a K^+ , Slo3, produce una hiperpolarización durante la capacitación, lo cual podría activar al sNHE a través del VSD. Finalmente, la actividad del sNHE generaría una alcalinización intracelular que activaría al canal de Ca^{2+} dependiente de pH, Catsper. Aunque es necesario describir con mayor detalle la

función de estas proteínas y la relación entre ellas, los resultados de nuestro trabajo apoyan la participación del sNHE en la vía de señalización descrita.

Conclusión

En este estudio, decidimos caracterizar el VSD del sNHE de ratón ($msNHE_{VSD}$) expresándolo en células HEK293. Sin embargo, la forma convencional de preparar el vector de expresión no fue exitosa por la alta toxicidad del $msNHE_{VSD}$ en bacterias. Para superar el problema, utilizamos dos métodos particulares para preparar nuestros plásmidos: 1) inserción de un codón de paro ambar y 2) inserción de un intrón. Ambas estrategias nos permitieron obtener los plásmidos deseados evitando la producción de la proteína completa en bacterias. Para expresar la proteína completa en células HEK293, co-transfectamos dos plásmidos: el que contiene la mutante Y665Ambar y pMAH-MYRS, que codifica los ARNts y la aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de una tirosina en lugar del codón de paro ambar. Este método no había sido utilizado previamente para una proteína no caracterizada que además es tóxica en bacterias. En cuanto a la segunda estrategia, la inserción del intrón es relativamente más laboriosa que la mutación por un codón de paro ambar. Sin embargo, tiene las ventajas de expresar la proteína más eficientemente y de no provocar un estrés extra a las células transfectadas. Hasta el momento, este método se había utilizado solamente para el estudio de proteínas virales.

Como se mencionó previamente, hasta la fecha no se han establecido métodos exitosos para expresar el sNHE de ratón, lo que ha impedido el avance de su estudio. Nuestro trabajo nos permite especular que esto está relacionado a la toxicidad producida por el VSD en bacterias. Además, resultados preliminares con un plásmido codificante para el sNHE completo (sintetizado por la compañía GenScript), sugieren que podría haber otras regiones tóxicas en la proteína. Por lo tanto, los métodos presentados en este trabajo serán importantes para futuros estudios que intenten ahondar más en las propiedades biofísicas del $msNHE$. Así mismo, podrán ser de utilidad para el estudio de muchas otras proteínas tóxicas para bacterias.

Referencias

- Arima, H., Tsutsui, H., Sakamoto, A., Yoshida, M., & Okamura, Y. (2018). Induction of divalent cation permeability by heterologous expression of a voltage sensor domain. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1860*(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.004>
- Arrigoni, C., Schroeder, I., Romani, G., van Etten, J. L., Thiel, G., & Moroni, A. (2013). The voltage-sensing domain of a phosphatase gates the pore of a potassium channel. *The Journal of General Physiology*, *141*(3), 389–395. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210940>
- Betzner, A. S., Oakes, M. P., & Huttner, E. (1997). Transfer RNA-mediated suppression of amber stop codons in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *11*(3), 587–595. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11030587.x>
- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, *80*(2), 555–592. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.555>
- Bouet, J. Y., Campo, N. J., Krisch, H. M., & Louarn, J. M. (1996). The effects on *Escherichia coli* of expression of the cloned bacteriophage T4 nucleoid disruption (nnd) gene. *Molecular Microbiology*, *20*(3), 519–528. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5411067.x>
- Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2014). Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1842, Issue 12, pp. 2610–2620). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>
- Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, *67*(6), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>
- Cavarocchi, E., Whitfield, M., Chargui, A., Stouvenel, L., Lorès, P., Coutton, C., Arnoult, C., Santulli, P., Patrat, C., Thierry-Mieg, N., Ray, P. F., Dulioust, E., & Touré, A. (2021). The sodium/proton exchanger SLC9C1 (sNHE) is essential for human sperm motility and fertility. *Clinical Genetics*, *October 2020*. <https://doi.org/10.1111/cge.13927>
- Chatterjee, A., Xiao, H., Bollong, M., Ai, H. W., & Schultz, P. G. (2013). Efficient viral delivery system for unnatural amino acid mutagenesis in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 11803–11808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309584110>
- Chávez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., de La Vega Beltrán, J. L., Treviño, C. L., Darszon, A., Salkoff, L., & Santi, C. M. (2014). SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(46), 32266–32275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607556>

- Chung, J. J., Shim, S. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2014). Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell*, 157(4), 808–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.056>
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De la Vega-Beltrán, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7001–7009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206284200>
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). *Rates of Spontaneous Mutation*. <https://academic.oup.com/genetics/article/148/4/1667/6034646>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L. A., Van Duin, M., Conti, M., Gossen, J. A., & Beavo, J. A. (2004). *Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400050101
- Gallegos, J. E., & Rose, A. B. (2015). The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Science*, 237, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.04.017>
- Gardner, C. C., & James, P. F. (2023). The SLC9C2 Gene Product (Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 11; NHE11) Is a Testis-Specific Protein Localized to the Head of Mature Mammalian Sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5329. <https://doi.org/10.3390/ijms24065329>
- González, J. M., Péntzes, Z., Almazán, F., Calvo, E., & Enjuanes, L. (2002). Stabilization of a Full-Length Infectious cDNA Clone of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus by Insertion of an Intron. *Journal of Virology*, 76(9), 4655–4661. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4655-4661.2002>
- Guo, J., He, Y., Wang, X., Jiang, B., Lin, X., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Chen, S., & Cheng, A. (2020). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone for duck Tembusu virus by insertion of an intron. *Journal of Virological Methods*, 283(June). <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113922>
- Hernández-Garduño, S., Chávez, J. C., Matamoros-Volante, A., Sánchez-Guevara, Y., Torres, P., Treviño, C. L., & Nishigaki, T. (2022). Hyperpolarization induces cytosolic alkalization of mouse sperm flagellum probably through sperm Na⁺/H⁺ exchanger. *Reproduction*, 164(4), 125–134.
- Hernández-Garduño, S., Chavez, J. C., Matamoros-Volante, A., Sanchez-Guevara, Y., Torres, P., Treviño, C. L., & Nishigaki, T. (2022). *Hyperpolarization of membrane potential activates sperm-specific sodium/proton exchanger of mouse, but not of human sperm*.

- Hofherr, A., Fakler, B., & Klöcker, N. (2005). Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers. *Journal of Cell Science*, 1935–1943. <https://doi.org/10.1242/jcs.02322>
- Hyun, S. L., Guo, J., Lemke, E. A., Dimla, R. D., & Schultz, P. G. (2009). Genetic incorporation of a small, environmentally sensitive, fluorescent probe into proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(36), 12921–12923. <https://doi.org/10.1021/ja904896s>
- Jin, L., Han, Z., Platisa, J., Wooltorton, J. R. A., Cohen, L. B., & Pieribone, V. A. (2012). Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron*, 75(5), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.040>
- Johansen, I. E. (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12400–12405. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12400>
- Kato, Y. (2019). Translational control using an expanded genetic code. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040887>
- Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439(February), 737–740. <https://doi.org/10.1038/nature04417>
- Kotera, I., & Nagai, T. (2008). A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme. *Journal of Biotechnology*, 137(1–4), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1816>
- Kumánovics, A., Levin, G., & Blount, P. (2002). Family ties of gated pores: evolution of the sensor module. *The FASEB Journal*, 16(12), 1623–1629. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0238hyp>
- Kwon, T., Sakamoto, M., Peterka, D. S., & Yuste, R. (2017). Attenuation of Synaptic Potentials in Dendritic Spines. *Cell Reports*, 20(5), 1100–1110. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.012>
- Levine, N., & Marsh, D. J. (1971). Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *The Journal of Physiology*, 213(3), 557–570. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009400>
- Liao, Y., Lescar, J., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2004). Expression of SARS-coronavirus envelope protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(1), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.050>
- Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J., & González-Martínez, M. T. (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1372(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00035-2)

- Liu, C. C., & Schultz, P. G. (2010). Adding new chemistries to the genetic code. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824>
- López-Moya, J. J., & García, J. A. (2000). Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research*, 68(2), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00161-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00161-1)
- Männikkö, R., Elinder, F., & Larsson, H. P. (2002). Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*, 419(2001), 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature01038>
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., & Chahine, M. (2014a). Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Frontiers in Pharmacology*, 5 APR(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00053>
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., & Chahine, M. (2014b). Molecular biology and biophysical properties of ion channel gating pores. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 47(4), 364–388. <https://doi.org/10.1017/S0033583514000109>
- Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., & Okamura, Y. (2005). Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*, 435(7046), 1239–1243. <https://doi.org/10.1038/nature03650>
- Musset, B., Smith, S. M. E., Rajan, S., Morgan, D., Cherny, V. v., & Decoursey, T. E. (2011). Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel. *Nature*, 480(7376), 273–277. <https://doi.org/10.1038/nature10557>
- Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193–199. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90434-D](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90434-D)
- Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C., & Schultz, P. G. (1989). A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, 244(4901), 182–188. <https://doi.org/10.1126/science.2649980>
- Nott, A., Meislin, S. H., & Moore, M. J. (2003). A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *Rna*, 9(5), 607–617. <https://doi.org/10.1261/rna.5250403>
- Okamura, Y., & Okochi, Y. (2019). Molecular mechanisms of coupling to voltage sensors in voltage-evoked cellular signals. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 95(3), 111–135. <https://doi.org/10.2183/PJAB.95.010>
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J., & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69(3), 517–528. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90452-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90452-I)
- Plugge, B., Gazzarrini, S., Nelson, M., Cerana, R., van Etten, J. L., Derst, C., DiFrancesco, D., Moroni, A., & Thiel, G. (2000). A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science*, 287(5458), 1641–1644. <https://doi.org/10.1126/science.287.5458.1641>

- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. a, Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. a, & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(4), 1219–1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>
- Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. a, & Clapham, D. E. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, *440*(7088), 1213–1216. <https://doi.org/10.1038/nature04700>
- Roesser, J. R., Chorghade, M. S., & Hecht, S. M. (1986). Ribosome-Catalyzed Formation of an Abnormal Peptide Analogue. *Biochemistry*, *25*, 6361–6365. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Romero, F., & Nishigaki, T. (2019). Comparative genomic analysis suggests that the sperm-specific sodium/proton exchanger and soluble adenylyl cyclase are key regulators of CatSper among the Metazoa. *Zoological Letters*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s40851-019-0141-3>
- Rosasco, M. G., Gordon, S. E., & Bajjalieh, S. M. (2015). Characterization of the Functional Domains of a Mammalian Voltage-Sensitive Phosphatase. *Biophysical Journal*, *109*(12), 2430–2491. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.004>
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Dao-shan, C., Lin, S. W., Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, *56*(1), 125–135. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90165-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90165-X)
- Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., & Bontems, F. (2006). Expression of Highly Toxic Genes in E. coli: Special Strategies and Genetic Tools. *Current Protein and Peptide Science*, *7*(1), 47–56. <https://doi.org/10.2174/138920306775474095>
- Santi, C. M., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., & Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Letters*, *584*(5), 1041–1046. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.005>
- Sanz, M. A., Pérez, L., & Carrasco, L. (1994). Semliki forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in Escherichia coli cells. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(16), 12106–12110.
- Sasaki, M., Takagi, M., & Okamura, Y. (2006). A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science*, *312*(5773), 589–592. <https://doi.org/10.1126/science.1122352>
- Starace, D. M., & Bezanilla, F. (2004). A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, *427*(February), 2–7.
- Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., Jovine, L., & Florman, H. M. (2012). Evolution of the voltage sensor domain of the voltage-sensitive phosphoinositide phosphatase VSP/TPTE suggests a role as a proton channel in eutherian mammals. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(9), 2147–2155. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss083>

- Tombola, F., Pathak, M. M., & Isacoff, E. Y. (2005). Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron*, *45*(3), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.047>
- Vieira, J., & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, *19*(3), 259–268. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4)
- Vu, K., Bautos, J., Hong, M. P., & Gelli, A. (2009). The functional expression of toxic genes: Lessons learned from molecular cloning of CCH1, a high-affinity Ca²⁺ channel. *Analytical Biochemistry*, *393*(2), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.039>
- Wachten, D., Jikeli, J. F., & Kaupp, U. B. (2017). Sperm sensory signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028225>
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. A., McLeroy, P., Moe, O. W., & Garbers, D. L. (2007). A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(22), 9325–9330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611296104>
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. a, Doolittle, L. K., & Garbers, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, *5*(12), 1117–1122. <https://doi.org/10.1038/ncb1072>
- Windler, F., Bönigk, W., Körschen, H. G., Grahn, E., Strünker, T., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2018). The solute carrier SLC9C1 is a Na⁺/H⁺-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature Communications*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05253-x>
- Wobig, L., Wolfenstetter, T., Fechner, S., Bönigk, W., Körschen, H. G., Jikeli, J. F., Trötschel, C., Feederle, R., Kaupp, U. B., Seifert, R., & Berger, T. K. (2020). A family of hyperpolarization-activated channels selective for protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(24), 13783–13791. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001214117>
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., Gossen, J. A., Esposito, G., van Duin, M., & Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, *296*(2), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.038>
- Young, D. D., & Schultz, P. G. (2018). Playing with the Molecules of Life. *ACS Chemical Biology*, *13*(4), 854–870. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00974>
- Younis, I., Berg, M., Kaida, D., Dittmar, K., Wang, C., & Dreyfuss, G. (2010). Rapid-Response Splicing Reporter Screens Identify Differential Regulators of Constitutive and Alternative Splicing. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(7), 1718–1728. <https://doi.org/10.1128/mcb.01301-09>

- Zeng, Y., Clark, E. N., & Florman, H. M. (1995). Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. In *Developmental Biology* (Vol. 171, Issue 2, pp. 554–563).
<https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1304>
- Zhao, J., & Blunck, R. (2016). The isolated voltage sensing domain of the Shaker potassium channel forms a voltage-gated cation channel. *ELife*, 5(OCTOBER2016), 1–18.
<https://doi.org/10.7554/eLife.18130>
- Zheng, L., Baumann, U., & Reymond, J. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research*, 32(14).
<https://doi.org/10.1093/nar/gnh110>

Apéndice. Secuencias de ADN y aminoácidos de las proteínas quiméricas

pCAGEN msNHE_{VSD}-Kcv-GFP

ATGGTCTTCACAAATGAATTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCCTATGATAATCTGTTGGATTTCCCGACTAAA
AGACATCTATGACAACGAGATAAAAATGTGCTAACTACTATTTTTCTTGCCTTCTATATTCTAGAGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGA
AGGAATTTTTTTCACACACCTGGCTCCTGTTTGAGCTGGGGATTACCTTAGTCGGCATCCTAGATATAATACTTATCGAAACAGACTCCATT
AGTTACAATTTTGACTTAACTGAGACTGTGGTCTTCATGAACGTGATTGACTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTTGTAAACCCAAA
ATTATTGATGTTAGTGTTTAGTAAATTTCTAACCGGAACCTGAACCATTCATGATACATCTCTTTATTCTCGCAATGTTTCGTGATGATCTATA
AATCTTCCCGGGAGGGTTCGAAAATAACTTCTCTGTTGCAAACCCGGACAAAAGGCATCATGGATAGATTGTATATACTTCGGAGTAAACG
ACACACTCTACTGTCGGATTTCGGAGATAACTGCCAAAGACGACCGGGCCAAAGCTTTGTACGATAGCACATATAGTAACAGTGTCTTCAT
CGTTCTAACTTTAAGGGCGCGCCGACAAATCGATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAACCGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACC
ACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA
GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCATCGACTTCAAGGAGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG
GAGTACAACATAACAGCCACAACGCTTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGA
GGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCA
CCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCATATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATG
GATGAACGTATAAATAA

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGILDIIILIEDSI
SYNFDLLETVVMNIRLLRILRILKLVTPKLLMLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKASWIDCIYFGVT
THSTVGFGDILPKTTGAKLCTIAHIVTVFFIVLTLGARRQIDMVSKEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKLTLLKFICT
TGKLPVWPPLVTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKL
EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGM
DELYK*

Colores: VSD. Kcv. GFP.

pCS2+ msNHE_{VSD}-pHuorina

ATGGTCTTCACAAATGAATTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCCTATGATAATCTGTTGGATTTCCCGACTAAA
AGACATCTATGACAACGAGATAAAAATGTGCTAACTACTATTTTTCTTGCCTTCTATATTCTAGAGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGA
AGGAATTTTTTTCACACACCTGGCTCCTGTTTGAGCTGGGGATTACCTTAGTCGGCATCCTAGATATAATACTTATCGAAACAGACTCCATT
AGTTACAATTTTGACTTAACTGAGACTGTGGTCTTCATGAACGTGATTGACTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTAGTAAACCCAAA
ACTACTGGGGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAACCTTTTCACTGGAGTTGTCCAATCTTGTGAAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACA
AATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCA
TGGCCAACACTTGTCACTACTTTAACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGC
CATGCCGGAAGGTATGTACAGGAAAGAATAATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACAGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATA
CCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAAACATCTTGGACACAAATGGAATACAACATAACGATCAC
CAGGTGTACATCATGGCAGACAAAAGAAAGAAATGGAATCAAAGCTAATTCAAAATTAGACACAAACATGGAAGATGGAGGCGTTCAACTAGC
AGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGGCCCGTCTTTTACCAGACAACCACTTACCTGTTACAACCTTCTACTCTTTGAAAG
ATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGATGGGATTACACATGGCATGGATGAACATAACAATGA

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGILDIIILIEDTSI
SYNFDLLETVVFMMVIRLLRILRILKLVTPKLLGDPMSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLLTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNNDH
QVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLFTTSTLSKDPNEKRDMVLLLEFVTADGITHGMEDELYK*

Colores: VSD. pHluorina.

pCS2+ VSD_{intrón}-pHluorina

ATGGTCTTCACAAATGAATTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCCTATGATAATCTGTTGGATTTCCCGACTAAA
AGACATCTATGACAACGAGATAAAAATGTGCTAACTACTATTTTTCTTGCCTTCTATATTCTAGAGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGA
AGGTAAGTATCAAGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCA
CCTATTGGCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGAATTTTTTTCACACACCTGGCTCCTGTTTGGAGCTGGGGATTACCTTAG
TCGGCATCTAGATATAATACTTATCGAAACAGACTCCATTAGTTACAATTTTGACTTAACTGAGACTGTGGTCTTCATGAACGTGATTCGA
CTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTAGTAACACCAAACTACTGGGGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGT
CCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGAGTGGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTA
CCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACTTGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGA
TACCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGACTATATTTTCAAGATGACGG
GAACTACAAGACAGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAA
ACATTTCTGGACACAAATGGAATACAACATAACGATCACCAGGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTC
AAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGGCCCGTCTTTTACC
AGACAACCATTACCTGTTTACAACCTTACTCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGGATTTGTAACAGCTG
ATGGGATTACACATGGCATGGATGAACATATACAAAATGA

Proteína truncada en bacterias:

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKSIVKTRQV*

Proteína completa en células HEK293:

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGILDIIILIEDTSI
SYNFDLLETVVFMMVIRLLRILRILKLVTPKLLGDPMSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLLTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNNDH
QVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLFTTSTLSKDPNEKRDMVLLLEFVTADGITHGMEDELYK*

Colores: VSD. Intrón. pHluorina.

pCS2+ VSD_{Y665Amb}-pHluorina

ATGGTCTTCACAAATGAATTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCCTATGATAATCTGTTGGATTTCCCGACTAAA
AGACATCTATGACAACGAGATAAAAATGTGCTAACTACTATTTTTCTTGCCTTCTATATTCTAGAGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGA
AGGAATTTTTTTCACACACCTGGCTCCTGTTTGGAGCTGGGGATTACCTTAGTCGGCATCTAGATATAATACTTATCGAAACAGACTCCATT
AGTTAGAATTTTGACTTAACTGAGACTGTGGTCTTCATGAACGTGATTTCGACTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTAGTAAACCAAA
ACTACTGGGGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACA
AATTTTCTGTGAGTGGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCA
TGGCCAACTTGTCACTACTTTAACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGC
CATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGACTATATTTTCAAGATGACGGGAAGTACAAGACACGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATA
CCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAACATCTTGGACACAAATGGAATACAACATAACGATCAC
CAGGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAGCGTTCAACTAGC

AGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGGCCCGCTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTTTACAACCTTCTACTCTTTTCGAAAAG
ATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTTGTAGTTTGTAAACAGCTGATGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAATGA

Proteína truncada en bacterias:

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGILDIIILIEDSIS*

Proteína completa en células HEK293:

MVFTNEFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGILDIIILIEDSISYNFDLLETVVFMMNVRLLRILRILKLVTPKLLGDPMSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVWPVLVTTLLTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNDHQVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHLYFTTSTLSKDPNEKRDMVLLLEFVTADGITHGMDELYK*

Colores: VSD. Inserción de codón de paro ambar. pHluorina.

pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}pHluorina (ExpSeq)

ATGGAGGGATTTCGACGGTTCAGATTTTAGTCTCCAGCTGATTAGTTGGCGTTCGCGTGCAGTCATGCGGAACGTCGTTGACGTCACGAT
AAATGGTGACGTCACCTGCTCCGCCGAAAGCTGCGCCAAGAAAAAGTGAATCGGTAAAGAAAGTTCATTGGAATGATGTAGACCAAGGACCGA
GTGAAAAACCAGAGACAAGACAGGAGAAATCTAGGATCACTTCAGAAGGGAGTATATCCCTTTGGACCAGATAGACATCAATGTTGACGGG
AGAATGGAGATACCTACTACTGGTGTAGGTCGCGTCCAGTTTCGTGTTTGAATATACTGGATACCTTGTGGTATTAATGAGCACATATCC
TATGATAATCTGTGGATTCCCGACTAAAAGACATCTATGACAACGAGATAAAAATGTGCTAACTACTATTTTCTTGCCTTCTATATTCTAG
AGGCTCTACTTAAGGTGGCAGCAATGAGGAAGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGAG
CAGAGAAGACTCTTGCCTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGAATTTTTTTCACACACCT
GGCTCCTGTTTGAGCTGGGGATTACCTTAGTCGGCATCTAGATATAATACTTATCGAAACAGACTCCATTAGTTACAATTTTACTTAACT
GAGACTGTGGTCTTCATGAACGTGATTCGACTCCTTCGTATACTGCGCATCTTGAAGCTTGTAACACCAAAAACACTGCGGGATCCCATGAG
TAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGTATTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAG
GTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACT
TTAAGTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCAGATCATAAGAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACA
GGAAGAAGTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACATAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGT
TAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATCTTGGACACAAATGGAATACAACATAACGATCACCAGGTGTACATCATGGCAGAC
AAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAGGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATAC
TCCAATTGGCGATGGGCCCGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTTTACAACCTTCTACTCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACC
ACATGGTCCCTTCTTGTAGTTTGTAAACAGCTGATGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAATTTTGCTATGAAAATGAAGTTTGA

MEGFDGSDFSPPADLVGVDGAVMRNVVDVTINGDVTAPPKAAPRKSESVKVHWNVDVQGPSEKPETRQEKSRITSEGEYIPLDQIDINVDG
RMEIPTTGVGRVQFRVFEYTGYLVLVLMSTYPMIICWISRLKDIYDNEIKCANYFLAFYILEALLKVAAMRKEFFSHTWLLFELGITLVGIL
DIIILIEDSISYNFDLLETVVFMMNVRLLRILRILKLVTPKLLGDPMSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKF
ICTTGKLPVWPVLVTTLLTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILG
HKLEYNYNDHQVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHLYFTTSTLSKDPNEKRDMVLLLEFVTADGIT
HGMDELYKFCYENEV*

Colores: N-terminal de Ci-VSP. Secuencia de exporte del Golgi. VSD. Intrón. pHluorina. Secuencia de exporte de Retículo endoplásmico.

Material suplementario

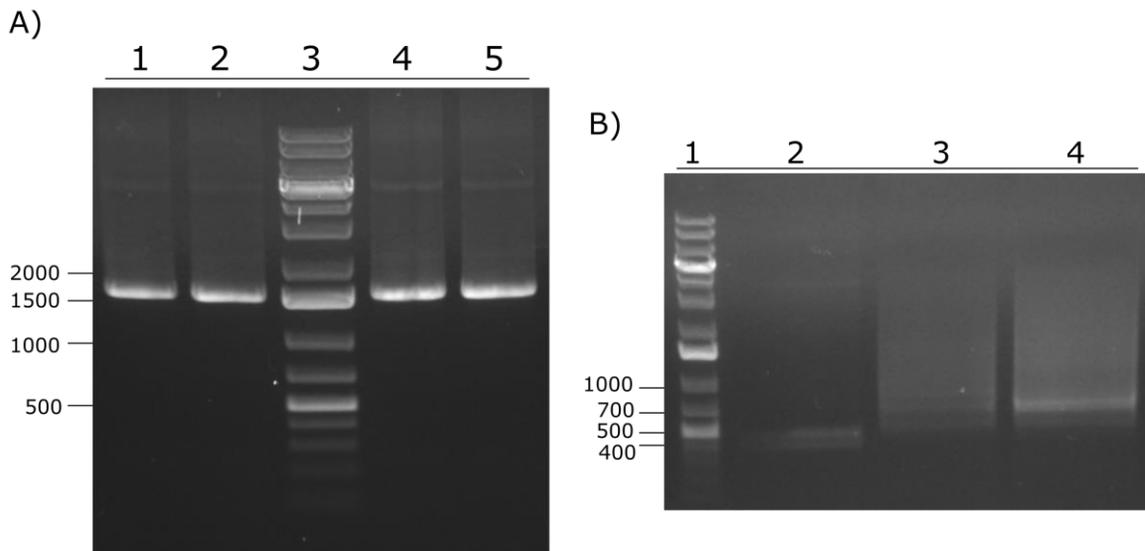


Figura suplementaria 1. Preparación de pCS2+ SpsNHE_{VSD}-pHluorina y pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina. Confirmación de la obtención correcta de las construcciones pCS2+ SpsNHE_{VSD}-pHluorina (A) y pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina (B) mediante PCR y patrón de digestión respectivamente. Los carriles A1-2 y A4-5 contienen los productos de PCR amplificados de plásmidos obtenidos de diferentes colonias de *E. coli*. Se usaron los oligonucleótidos 13F y 22R. El tamaño esperado fue de 1512 pb. Los carriles B3-4 contienen el patrón de digestión con las enzimas BamHI y HindIII de plásmidos obtenidos de diferentes colonias de *E. coli*. El tamaño esperado fue de 686 pb. El segundo plásmido se mandó a secuenciar y se usó en los experimentos posteriores. Los carriles A3 y B1 contienen el marcador de peso molecular.

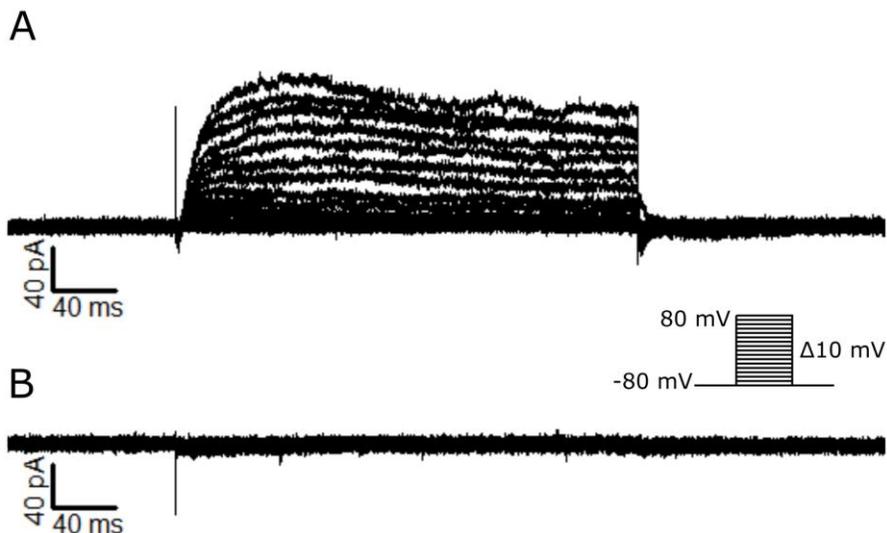


Figura suplementaria 2. La proteína quimérica con el VSD del sNHE de humano, pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina, no genera corrientes iónicas a diferencia del VSD de ratón. Registros representativos de la corriente iónica de células HEK293 transfectadas con pCS2+ NtVSP-VSD_{intrón}-pHluorina (ExpSeq) (A) o con pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina (B). En los dos casos se usó un protocolo de pulsos cuadrados de -80 a 80 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. N=5 en los dos casos.

Tabla de información de los oligonucleótidos usados en la preparación de la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina

No. de PCR	Objetivo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
19	Para la clonación del VSD del sNHE de humano en pJET1.2	18F: ATGGCTGGAATATTTAAGGAGTTTTTTTTC	18R: CTTCGGTCTTCTTAACAGTCTTAC
20	Para la amplificación del VSD del sNHE de humano que sustituyó el VSD de Arclight-Q239	20F: CCCAAGCTTACCATGGTGTCTTACTGAGGAA	20R: CACGGATCCCCCAGTAACTTTGGTGC

21	Para la amplificación del N-terminal de Ci-VSP	13F (Ver materiales y métodos)	21R: CCGCTCTTCACACGAAACTGGACGCGA
22	Para la confirmación por PCR de la construcción pCS2+ SpsNHE _{VSD} -pHluorina	13F	22R: TTAACCACTCCACACCTC

Preparación de la proteína quimérica pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina

A partir de ADNc de humano (Human Testis QUICK-Clone cDNA Cat: 637209 de Clontech) se amplificó por el PCR19 el VSD del sNHE con los oligonucleótidos 18F y 18R. El fragmento amplificado se ligó al vector pJET1.2 para obtener pJET1.2 hsNHE_{VSD}. El VSD se volvió a amplificar por el PCR20 con los oligonucleótidos 20F y 20R para insertar los sitios de restricción Lglu y BamHI. Simultáneamente se amplificó por el PCR21 el N-terminal de Ci-VSP con los oligonucleótidos 13F y 21R, con este último se insertó el sitio de restricción para Lglu. Los dos productos de PCR se purificaron y ligaron. El fragmento final se purificó y ligó al vector pCS2+ para unirlo a pHluorina y así obtener pCS2+ NtVSP-hsNHE_{VSD}-pHluorina.

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de pCS2+ NtVSP-hsNHE-pHluorina

ATGGAGGGATTGACGGTTTCAGATTTTAGTCTCCAGCTGATTTAGTTGGCGTTGACGGTGCAGTCATGCGGAACGTCGTTGACGTCACGAT
AAATGGTGACGTCAGTCTGCCGCCGAAAGCTGCCCAAGAAAAGTGAATCGGTAAAGAAAAGTTCATTGGAATGATGTAGACCAAGGACCGA
GTGAAAACCAGAGACAAGACAGGAGGAACGAATAGATATACCCGAGATTTTCAGGTCTATGGTGGGGCGAGAATGAACATGGAGTGGACGAT
GGGAGAATGGAGATACCTACTACTGGTGTAGGTGCGGTCCAGTTTCGTGTT**CATGTTGGATACCTTGTGATATTAATGAATATATTTCCCTT**
TATAATCTCTGGATATCCAGTTAAATGTAATCTACCACAGCGAATTAACACACTAACTACTGTTTTCTTACACTTTATATTTCTAGAGG
CACTACTTAAAGATAGCAGCAATGAGGAAGGACTTTTTTTCACATGCCTGGAACATATTCGAGTTAGCAATTACATTAATTGGCATCTTACAT
GTAATACTTATTGAAATAGACACCATTAAGTATATTTTTAATGAGACTGAAGTAATAGTCTTTATAAAAGTTGTTCAATTTTTTCGTATACT
ACGCATTTTCAAGCTCATAGCACCAAAGTTACTGGGGATCCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTTGTG
AATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAACACTTACCCTTAAATTTATT
TGCACTACTGGAAAACCTCTGTTCCATGGCCAAACACTTGTCACTACTTTAACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATAT
GAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACATATTTTTTCAAGATGACGGAACTACAAGACAC
GTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTAAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTTCTGGACAC
AAATTGGAATACAACATAACGATCACCAGGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTAGACACAA

CATGAAGATGGAGCGTTCAACTAGCAGACCATTTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGGCCCGTCCTTTTACCAGACAACCATTACC
TGTTTACAACCTTCTACTCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGATGGGATTACACAT
GGCATGGATGAACATATACAAATGA

MEGFDGSDFSPPADLVGVDGAVMRNVVDVTINGDVTAPPKAAPRKSESVKKVHNDVDQGPSEKPETRQEERIDIPEISGLWGENEHGVDD
GRMEIPTTGVGRVQFRVHVGYLVIILMNIFPFIISWISQLNVIYHSELKHTNYCFLTYILEALLKIAAMRKDFFSHAWNIFELAITLIGILH
VILIEIDTIKYIFNETEVIVFIKVVQFFRILRIFKLIAPKLLGDPMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSSEGEEDATYKLTLLKFI
CTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH
KLEYNYNDHQVYIMADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHLYFTTSTLSKDPNEKRDHMLLEFVTADGITH
GMDELYK*

Colores: N-terminal de Ci-VSP. VSD. pHluorina.