



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Propiedades funcionales, interacciones proteicas y distribución de los canales de potasio GIRK4 y GIRK5 de la rana *Xenopus laevis*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Karla Alejandra Chávez García

Leonila Irma Laura Escobar Pérez
Facultad de Medicina

Héctor Riveros Rosas
Facultad de Medicina
Javier Plasencia de la Parra
Facultad de Química

Ciudad de México. Marzo, 2024



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: "Propiedades funcionales, interacciones proteicas y distribución de los canales de potasio GIRK4 y GIRK5 de la rana *Xenopus laevis*" que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Una firma manuscrita en tinta que parece decir 'Kchg'.

**Karla Alejandra Chávez García
311185593**

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez en el Edificio A, Laboratorio 510 del Departamento de Fisiología, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Héctor Riveros Rosas	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Carolina Salvador Hernández en los experimentos de biología molecular, de la Dra. Zinaeli López González en los ensayos de microscopía confocal y del Dr. Daniel León Aparicio en los ensayos de proteómica y electrofisiología, así como al Químico Daniel Quezada Suaste por la obtención de los registros electrofisiológicos.

El apoyo financiero para la realización del trabajo experimental corrió a cargo de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico DGAPA (proyecto IN204123).

Durante la realización de la maestría, conté con el apoyo económico del Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado 2021, otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), actualmente llamado Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT). Adicionalmente, recibí una beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica PAPIIT (IN204123).

Índice de contenidos

Lista de abreviaturas.....	6
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Canales iónicos	9
Canales de potasio	10
Canales de K ⁺ rectificadores entrantes (Kir).....	11
Canales Kir3 (GIRK)	12
Activación de los canales GIRK por proteínas G heterotriméricas	12
2.2 <i>Xenopus laevis</i>	14
Ovocitos de <i>X. laevis</i>	15
Expresión de canales iónicos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	16
2.3 Proceso de maduración de ovocitos	16
Maduración de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	17
Participación de canales iónicos en el proceso de maduración.....	20
Participación de canales de potasio en el proceso de maduración.....	20
2.4 Fosforilación de canales iónicos	21
El papel de la fosforilación en el proceso de maduración.....	21
Cinasas de tirosina	22
2.5 Proteómica	23
3. Antecedentes.....	25
2.1 Canal GIRK5	25
2.1.1 GIRK5.S.....	28
2.2 Proteómica de canales GIRK.....	30
4. Justificación	32
5. Hipótesis.....	32
6. Objetivos.....	33
6.1 Objetivo general	33
6.2 Objetivos particulares	33
7. Metodología.....	34
7.1 Obtención y manejo de ovocitos.....	34
Ovariectomía parcial	34
Manipulación de ovocitos.....	34
Microinyección de mRNA en ovocitos	35
Lisado celular.....	35

Determinación de la concentración de proteínas (Método Lowry)	36
7.2 Registro electrofisiológico de las corrientes entrantes de potasio en los ovocitos.....	36
7.3 Ensayo de maduración	37
Preparación de muestra y controles.....	37
Electroforesis y análisis por Western Blot	37
7.4 Distribución de los canales GIRK5 y GIRK5.S en distintos órganos de la rana <i>Xenopus laevis</i>	38
7.5 Obtención de interactomas.....	39
Inmunoprecipitación.....	40
Elución desnaturante:	41
Electroforesis:	41
Ensayo proteómico	41
7.6 Efecto del inhibidor PP1 en la localización del canal GIRK5.....	43
Corte histológico	44
Microscopía confocal	45
8. Resultados y discusión.	46
8.1 Expresión funcional del canal GIRK4 en el ovocito	46
8.2 Efecto de la sobreexpresión del canal GIRK4 en la maduración del ovocito.....	48
8.3 Distribución de los canales GIRK5 y GIRK5.S en la rana hembra <i>X. laevis</i>	51
8.4 Proteómica	53
8.4.1 Interactoma del inmunoprecipitado formado empleando el anticuerpo anti-GIRK4.	55
8.4.2 Interactoma del inmunoprecipitado formado empleando el anticuerpo anti-GIRK5	59
8.5 Efecto del inhibidor de cinasas de tirosina PP1 en la localización del canal GIRK5... 61	
8.5.1 Registros electrofisiológicos	62
8.5.2 Microscopía confocal	63
9. Conclusiones	67
10. Preguntas actuales.	68
11. Perspectivas	68
11. Literatura citada	69
Apéndice.....	84

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácido
ac	Anticuerpo
ag	Antígeno
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
C-terminal	Región carboxilo terminal
Ca²⁺	Ion calcio
CIR	Rectificador entrante cardiaco
Cl⁻	Ion cloruro
EGFP	Proteína verde fluorescente
E_K	Potencial de equilibrio del ion potasio
EM	Espectrometría de masas
GABA	Acido gamma aminobutírico
GDP	Guanosin difosfato
Gi	Proteína G de tipo inhibitoria
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante regulado por proteínas G
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosin trifosfato
GVBD	Ruptura de la vesícula germinal (Germinal Vesicle Break Down)
HUGO	Organización del genoma humano (HUman Genome Organization)
ip	Inmunoprecipitado
IPP	Interacción proteína-proteína
K⁺	Ion potasio
KATP	Canales de potasio sensibles a ATP
HCN	Canales de potasio activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
kDa	KiloDalton
Kir	Canal de potasio rectificador entrante (Inward Rectifying Potassium channel)
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje (Voltage-gated potassium channel)
LC	Cromatografía de líquidos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mm	Milímetros
MPF	Factor promotor de maduración
mV	MiliVolts
N-terminal	Región amino terminal
Na⁺	Ion sodio
nM	Nanomolar
P	Región del poro

P4	Progesterona
PK	Piruvato cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PTK	Proteínas cinasas de tirosina
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFK	Familia de cinasas Src
TM	Segmentos transmembranales
TOK	Canal de potasio rectificador saliente
Xir	Canal de potasio rectificador entrante de la rana <i>Xenopus laevis</i> (Xenopus Inward Rectifier)
<i>X. laevis</i>	Rana de la especie <i>Xenopus laevis</i>
Y16	Aminoácido tirosina situado en la posición 16 de la secuencia del canal GIRK5
μM	Micromolar

1. Resumen

Los canales GIRK son canales de potasio rectificadores entrantes que se activan por las subunidades beta-gamma de las proteínas G heterotriméricas ($G\beta\gamma$). El canal GIRK5 se expresa en el ovocito de la rana *Xenopus laevis* (*X. laevis*) y participa en su maduración, aún se desconoce el mecanismo. La isoforma GIRK5-wt no se expresa en la membrana plasmática como un canal iónico activo, debido a que presenta un motivo de retención (KRXY) de retículo endoplásmico. La desfosforilación de un residuo de tirosina en la posición 16 (Y16) del extremo amino terminal (N-terminal) de GIRK5 permite su traslocación hacia la membrana plasmática, donde es capaz de generar corrientes entrantes de potasio e inducir la maduración del ovocito en ausencia de progesterona. Comparado con su ortólogo GIRK4, GIRK5 tiene un N-terminal más largo; pensamos que dicha secuencia podría estar relacionada con su participación en la maduración del ovocito.

Se encontró que GIRK4 no induce la maduración del ovocito de *X. laevis* y que existe un parólogo de GIRK5 (GIRK5.S) que también se expresa en el ovocito. No se lograron identificar las interacciones proteína-proteína de los canales GIRK4 y GIRK5 mediante ensayos de inmunoprecipitación y proteómica; en contraste, ensayos preliminares indican que el inhibidor de cinasas de tirosina Src, PP1, promueve la desfosforilación de GIRK5, por lo tanto, su traslocación de la membrana plasmática.

2. Introducción

2.1 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el flujo de iones a través de las membranas (Barker et al., 2017). El paso de los iones por los canales iónicos ocurre a través de un poro (región P), en el cual se encuentra un “filtro de selectividad” que le confiere al canal la capacidad de discriminar entre distintos iones, así como regular su velocidad de conducción. Hay canales selectivos para cada tipo de ion: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloruro (Cl), principalmente (Hille, 2001).

La apertura del poro de un canal iónico ocurre en respuesta a un estímulo específico. De acuerdo con el tipo de estímulo, los canales iónicos se clasifican como: activados por voltaje (*voltage-gated ion channels*), cuando se abren en respuesta a cambios del potencial de membrana y, activados por ligando (*ligand-gated ion channels*) cuando responden a la unión de un ligando específico, como hormonas o neurotransmisores (Barker et al., 2017). Otra categoría de canales iónicos son los que se abren por estrés mecánico (*mechanically-gated channels*) (Alberts et al., 2002).

Los canales iónicos son responsables de la excitabilidad eléctrica de las células musculares y del sistema nervioso y cardíaco y de glándulas como el páncreas, sin embargo, no son exclusivos de las células eléctricamente excitables que generan potenciales de acción. Los canales iónicos están presentes en todas las células animales, vegetales y en algunos microorganismos (Alberts et al., 2002).

Los canales iónicos más abundantes son los que son permeables al potasio y se encuentran distribuidos en la membrana plasmática de las células. Los canales de potasio de la familia de rectificadores entrantes (Kir) están abiertos en las células en condiciones de reposo (“canales de fuga”) y permiten que la membrana plasmática sea más permeable al potasio que a otros iones, por lo tanto, tienen un papel crucial en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo (Alberts et al., 2002).

Canales de potasio

El potasio es el ion que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula (140 mM). Los canales de potasio cumplen un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana en el reposo (Alberts et al., 2002), mantienen el potencial de membrana en un valor muy cercano al del potencial de equilibrio del ion potasio (-98 mv) (Hille, 2001).

Los canales de potasio forman dímeros o tetrámeros (Doyle et al., 1998) de subunidades α . Cuatro subunidades α forman un poro selectivo al paso de K^+ a través de la bicapa lipídica. Los canales de potasio se clasifican en cuatro familias, dependiendo del número de segmentos transmembranales (TM) y poros (P) que poseen: 2TM/1P, canales con dos dominios transmembranales y un poro, como los canales rectificadores entrantes (Kir) y el canal de potasio bacteriano KcsA; 4TM/2P (TWK); 6TM/1P a los que pertenecen los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), los canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN) y, por último, los canales de potasio 8TM/2P, que incluye a los canales de potasio rectificadores salientes (TOK) (Biggin et al., 2000; Choe, 2002) (figura 1).

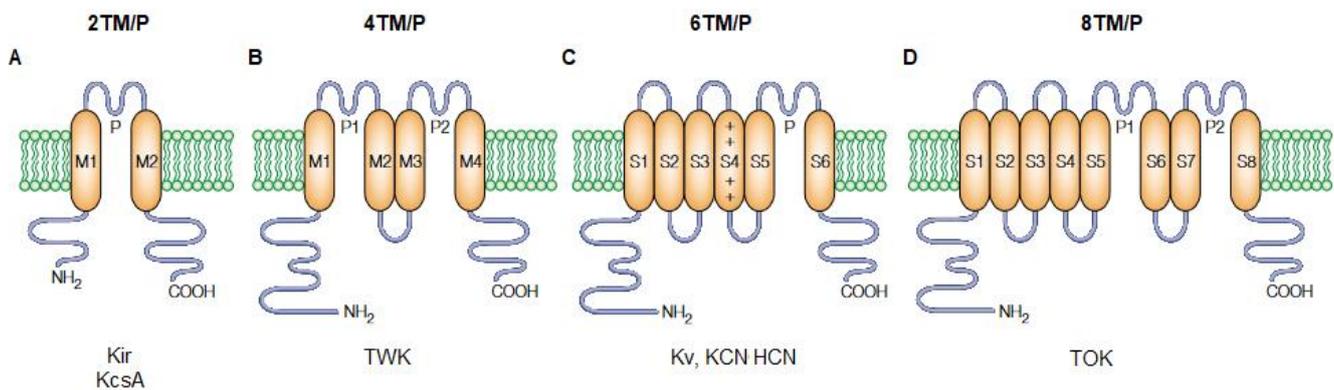


Figura 1. Diagramas esquemáticos de la topología de los canales de potasio rectificadores entrantes. Existen cuatro tipos de canales de potasio, de acuerdo con el número de segmentos transmembranales (TM) y regiones del poro que presentan. Modificada de (Choe, 2002)

Canales de K⁺ rectificadores entrantes (Kir)

Los canales tipo Kir fueron descritos por primera vez por Bernard Katz (1949) en el músculo esquelético de la rana. Los canales Kv eran los únicos canales rectificadores salientes (permiten el flujo de los iones solo hacia el citoplasma) que se conocían hasta entonces, por lo que a los canales Kir se les denominó “rectificadores anómalos” (Hille, 2001). La corriente anómala o de rectificación entrante predomina a potenciales por debajo del potencial de equilibrio del potasio y desaparece a voltajes despolarizantes. El fenómeno de “rectificación entrante” se refiere a la capacidad de un canal iónico de permitir una mayor entrada que salida de iones (Bichet et al., 2003). Los canales Kir cumplen la función de mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio del ion potasio (E_K). En células excitables, los canales Kir regulan la excitabilidad membranar inhibitoria, la secreción de insulina por el páncreas, la frecuencia cardiaca y el balance electrolítico (Bichet et al., 2003; Z. Guo et al, 2003). Estructuralmente, los canales Kir poseen dos segmentos transmembranales (M1 y M2), un poro extracelular y sus extremos amino y carboxilo intracelulares (figura 1).

Los canales Kir permiten la entrada de iones potasio, mientras que las corrientes de salida están bloqueadas. El bloqueo del poro ocurre a potenciales despolarizantes, en gran medida por la presencia de iones de magnesio intracelulares y, en rectificadores fuertes, también ocurre por un mecanismo de “rectificación intrínseca” mediado por poliaminas citoplásmicas (espermina, espermidina, putrescina y cadaverina) (Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994).

La familia de los canales Kir se divide en 7 subfamilias (Kir₁₋₇) y se clasifican en 4 grupos funcionales: canales Kir clásicos (Kir_{2.x}) constitutivamente activos; canales Kir activados por proteína G (Kir_{3.x}), regulados por receptores acoplados a proteínas G (GPCR); canales de potasio sensibles a ATP (Kir_{6.x}) y canales transportadores de potasio (Kir_{1.x}, Kir_{4.x}, Kir_{5.x} y Kir_{7.x}) (Hibino et al. 2010).

Los canales Kir se encuentran localizados en una amplia variedad de células, tanto excitables y no excitables, como: cardiomiocitos, neuronas, osteoclastos, leucocitos, células endoteliales y epiteliales, células de la glía, de músculo liso, riñón y ovocitos (Hibino et al., 2010). La regulación de los canales Kir puede ser de forma directa:

por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores, entre otros metabolitos celulares (Hille, 2001); y por elementos intracelulares y membranales, como nucleótidos cíclicos, fosfolípidos, ATP, cinasas, acidificación intracelular, lípidos, entre otros (Bichet et al., 2003; Ruppertsberg, 2000). Los canales de la subfamilia Kir3, también llamada GIRK (canales de potasio rectificadores entrantes regulados por proteínas G) son los únicos que se modulan por receptores acoplados a proteínas G_i sensibles a hormonas y neurotransmisores (Hille, 2001).

Canales Kir3 (GIRK)

Los canales Kir3 participan en las sinapsis inhibitorias, a través de una gran variedad de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas tipo $G_{ai} / G_{\alpha 0}$. Cuando los neurotransmisores como la acetilcolina, dopamina, opioides, serotonina, somatostatina, GABA o adenosina, se unen a su receptor GPCR a $G_{ai} / G_{\alpha 0}$, activan a los canales GIRK; son activados por la acción del dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G (Pfaffinger et al., 1985., Wettschureck & Offermanns, 2005; Q. Zhang et al., 2002).

Hasta el momento se han clonado cinco miembros de la familia GIRK (Kir3.1-Kir3.5): GIRK1 (KCNJ3) fue el primer canal GIRK clonado, de corazón de ratón (Kubo et al., 1993); GIRK2 (KCNJ6) y GIRK3 (KCNJ9) fueron clonados de cerebro de ratón (Lesage et al., 1994), GIRK4 de células cardiacas (Krapivinsky et al., 1995) y el canal GIRK5 fue clonado de los ovocitos de la rana *X. laevis* (Hedin et al., 1996).

Activación de los canales GIRK por proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades: alfa (α), beta (β) y gama (γ). Las dos últimas forman un dímero estable ($G\beta\gamma$) que se disocia cuando se desnaturaliza la proteína. La subunidad $G\alpha$ tiene sitios de unión para GDP y para el dímero $G\beta\gamma$, cuando el GPCR se activa, se promueve el intercambio de GDP por GTP y la separación de la subunidad $G\alpha$ GTP, tanto del receptor, como del dímero $G\beta\gamma$. Las subunidades libres ($G\alpha$ GTP y $G\beta\gamma$) modulan la actividad de una amplia variedad de efectores como enzimas y canales de potasio (Kir) y de calcio (Cav). La señalización termina debido a la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$ que

convierte el GTP en GDP. El trímero se asocia nuevamente y regresa al estado basal (Wettschureck & Offermanns, 2005).

La subunidad $G\alpha$ confiere las propiedades básicas de las proteínas G y se subdividen en cuatro familias: $G_{\alpha s}$ (activa a la enzima adenilato ciclasa), $G_{\alpha q} / G_{\alpha 11}$ (activa a la fosfolipasa C), $G_{\alpha 12} / G_{\alpha 13}$ (activa a la fosfolipasa A2) y $G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$ (inhiben a la enzima adenilato ciclasa) (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Los canales GIRK son activados directamente por el dímero $G\beta\gamma$ que es liberado tras la activación de los receptores acoplados a proteína G del tipo inhibitorio ($G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$) (figura 2) (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Cuando el receptor se activa, las proteínas heterotriméricas $G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$ se activan y la subunidad $G_{\alpha i}$ inhibe a la enzima adenilato ciclasa. Se ha demostrado que la subunidad $G\beta 1\gamma 2$ interactúa directamente en diversas regiones con los extremos N y C terminal de los canales GIRK (C. L. Huang et al., 1995; C.-L. Huang et al., 1997).

Un claro ejemplo de activación de un canal GIRK ocurre cuando se practican rutinas de estiramiento y relajación que produce la liberación de acetilcolina (Ach), por la estimulación del nervio vago. A su vez, la Ach activa al receptor muscarínico tipo 2 en el corazón y se promueve la apertura de los canales GIRK1/GIRK4. La hiperpolarización inducida, promueve la disminución de la frecuencia cardiaca (Lesage et al., 1995).

Además del dímero $G\beta\gamma$, la activación de los canales GIRK está controlada por varios moduladores intracelulares como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), Na^+ , eicosanoides, ATP, Mg^{2+} y por fosforilación (Choe, 2002; Mark & Herlitze, 2000)

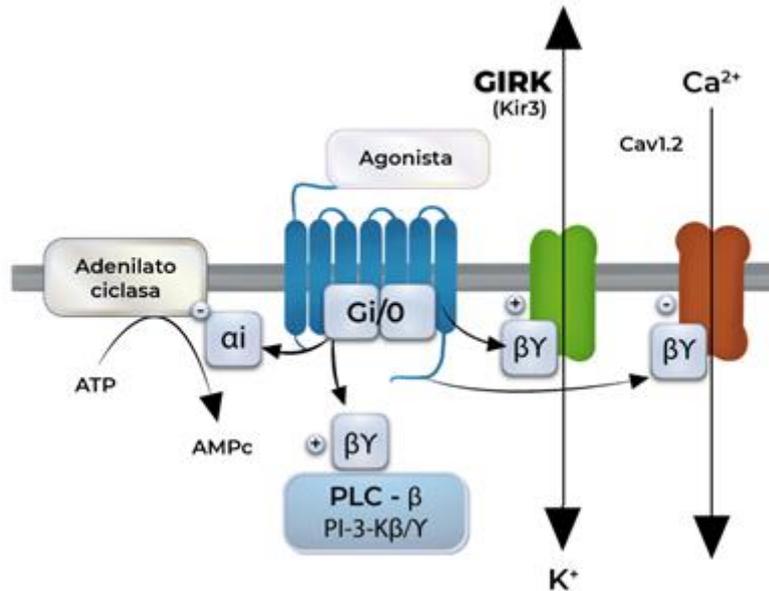


Figura 2. Vía de señalización de las proteínas G_{αi} / G_{αo}. La unión del agonista a un receptor acoplado a proteínas G, produce cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G_α; el trímero G_{αβγ} se disocia y la subunidad G_α1 inhibe la cascada de señalización de la enzima adenilato ciclasa. Por su parte, el dímero G_{βγ} activa a los canales GIRK [modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005]

2.2 *Xenopus laevis*

La rana de uñas sudafricana, *X. laevis* es un modelo importante para el estudio del desarrollo de los vertebrados, en biología celular e inmunología, además del estudio de poliploidía en invertebrados. *X. laevis* posee un genoma alotetraploide (Session et al. 2016; Graf y Kobel 1991), lo que significa que tiene 4 pares de cromosomas no homólogos (2n=36); posee casi el doble de dotación cromosómica que la rana de uñas occidental *X. tropicalis* (2n=20), entre otras especies de ranas diploides (Session et al. 2016). Su cariotipo revela 18 pares de cromosomas; 9 pares de cromosomas son homólogos, dentro de cuales, los primeros 8 pares reciben el nombre del cromosoma correspondiente de *X. tropicalis*, añadiendo una “L” o una “S” para los cromosomas homólogos largos y cortos, respectivamente (Session et al. 2016). Así, el cromosoma 7S y 7L son los cromosomas homólogos 7 corto y 7 largo, respectivamente.

Ovocitos de *X. laevis*

Los ovocitos de la rana sudafricana *X. laevis* son células de gran tamaño; cuando se encuentran en el estadio VI de crecimiento tienen un diámetro de 1 a 1.3 mm, lo que permite su fácil manejo con pipetas pasteur y la aplicación de diversas técnicas como la microinyección de DNA/RNA y ensayos electrofisiológicos (Weber, 1999).

Los ovocitos de *X. laevis* son células asimétricas con una polaridad interna compleja, con un polo animal de color oscuro que contiene al núcleo, al retículo endoplásmico y a los gránulos pigmentados (Merriam et al., 1983). En contraste, en el polo vegetal (color amarillo pálido) se encuentra el plasma germinal, que es la fuente de DNA del ovocito, además de una nube mitocondrial (figura 3) (King et al., 2005; Kloc et al., 2001).



Figura 3. El ovocito de *X. laevis* está dividido en dos polos: el polo animal (color café) contiene al núcleo, retículo endoplásmico y gránulos pigmentados; mientras que el polo vegetal (color amarillo) contiene al plasma germinal y una nube mitocondrial.

Xenbase.org

El RNA mensajero inyectado en ovocitos de *X. laevis*, se traduce eficientemente a proteínas funcionales, incluyendo modificaciones post-traduccionales, por lo que han sido utilizados como sistemas de expresión heteróloga de proteínas, principalmente de receptores y canales iónicos (Gurdon et al., 1971).

Los ovocitos de *X. laevis* constituyen un buen modelo para estudiar las propiedades eléctricas y farmacológicas de una gran variedad de canales iónicos recombinantes; adicionalmente, han sido ampliamente utilizados como un modelo para el estudio del ciclo celular, la biología del desarrollo y la maduración (Nebreda & Ferby, 2000; Weber, 1999). Sin embargo, es necesario mencionar que, en ocasiones, el uso de los ovocitos de *X. laevis*, como modelo de estudio puede presentar algunos inconvenientes, como: variaciones estacionales, variación biológica entre ovocitos de distintas donantes, tiempo de vida corto una vez extraídos de la rana (en

promedio 14 días), sensibilidad al estrés y a cambios en la temperatura ambiental (Weber, 1999).

Expresión de canales iónicos en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *X. laevis* poseen canales iónicos endógenos, entre ellos se encuentran una gran variedad de canales de cloruro (Miledi, 1982), canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Barish, 1983; Miledi, 1982), canales de potasio del tipo rectificador tardío (L. Lu et al., 1990) y canales de potasio del tipo rectificador entrante (Hedin et al., 1996).

Hace varios años, Hedin y Clapham identificaron corrientes entrantes de potasio en el ovocito de *X. laevis*, permitiendo aislar el cDNA del canal GIRK5 (Xir) (Hedin et al., 1996). En este sentido, el uso de los ovocitos permitió registrar la corriente endógena de los canales GIRK sin la activación de un receptor metabotrópico, debido a la existencia de una poza endógena de proteínas $\text{G}\beta\gamma$ libres que permite su activación (Lutz et al., 2000).

2.3 Proceso de maduración de ovocitos

La maduración del ovocito es una red compleja de vías de transducción de señales que culmina en la activación-inactivación cíclica del factor promotor de la maduración (MPF) que está compuesto por ciclina B y cdc2 (Philpott, 2004); la progesterona ovárica es el desencadenante natural en la maduración de los ovocitos de anfibios (Bayaa, 2000).

El proceso de maduración comprende la última etapa por la que pasa una célula germinal para adquirir la capacidad de ser fecundada. Este proceso está caracterizado por la disolución de la envoltura nuclear, también llamada "rompimiento de la vesícula germinal", la extrusión del primer cuerpo polar y la condensación de los cromosomas (Nader, 2016). La maduración comienza cuando el ovocito es liberado del primer arresto meiótico que es cuando se rompe la vesícula germinal (GVBD) y los cromosomas se condensan en un estado de metafase. En la rana, la maduración es inducida por progesterona mediante un mecanismo no genómico, mediado por la acción de diversas cascadas de

señalización intracelular. La progesterona es secretada por las células foliculares que rodean a los ovocitos en respuesta a gonadotropinas secretadas por la hipófisis (Philpott, 2004).

Maduración de los ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *X. laevis* se encuentran en un estado arrestado, durante la profase de la meiosis 1, en la que ocurre la acumulación de macromoléculas necesarias para continuar con la división celular (Maller & Krebs, 1980; Nader, 2016). La progesterona, mediante un mecanismo no genómico, desencadena la reanudación de la meiosis 1, permitiendo la entrada del ovocito a metafase 1 y posteriormente a meiosis 2. Durante metafase 2, el ovocito entra en un segundo arresto meiótico durante la metafase 2, señal de que el ovocito ha completado su proceso de maduración y está listo para ser fecundado. Mientras que la liberación del primer arresto ocurre por la acción de la progesterona, la liberación del segundo arresto ocurre después de que el ovocito es fertilizado (Josefsberg Ben-Yehoshua et al., 2007).

Durante la transición profase 1-metafase 1 de la meiosis 1, la membrana del núcleo del ovocito inmaduro, también llamado vesícula germinal, se desintegra liberando al citoplasma el material genético, que posteriormente se dividirá dando lugar a dos células hermanas que entrarán en meiosis 2. Esta desintegración, o ruptura de la vesícula germinal (GVBD) es un evento crucial que marca la entrada del ovocito al proceso de maduración, un proceso en el que el ovocito pasa de un estado inactivo a uno activo, listo para poder ser fecundado. La GVBD se puede apreciar a simple vista en un ovocito como la aparición de un punto blanco en el polo animal (Osumi, 1994; Josefsberg Ben-Yehoshua et al., 2007; Nader, 2016).

El receptor de progesterona ($XmPR\beta$) es un GPCR que participa en la reanudación de la meiosis del ovocito (Josefsberg Ben-Yehoshua et al., 2007). La unión de la progesterona a su receptor induce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, promoviendo la disminución de los niveles plasmáticos de AMPc, con la subsecuente inhibición de la enzima PKA (Wang & Liu, 2004).

La enzima PKA, en ovocitos de *X. laevis*, cataliza la fosforilación de la fosfatasa cdc25, promoviendo el arresto meiótico (Duckworth et al., 2002; Matten et al., 1994). En contraste, la inhibición de PKA, por acción de la progesterona, promueve la activación del factor promotor de maduración (Figura 4), mediante la activación de la vía de la MAPK y la activación de cdc25 (Marteil et al., 2009).

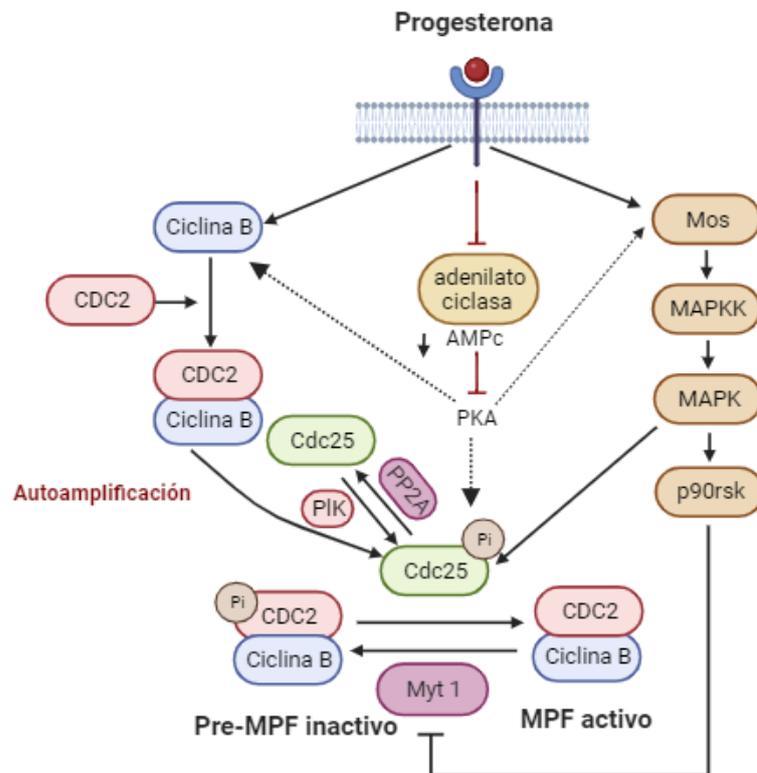


Figura 4: Vía de señalización no genómica de la progesterona. La unión de la progesterona a su receptor membranal, activa al factor promotor de maduración (MPF) desde distintas vías: 1. La vía Mos/MAPK, contribuye a la activación de MPF, a través de la activación de la fosfatasa CDC25 y la inhibición de la cinasa Myt1; 2. La síntesis de novo de la proteína Ciclina B, induce la formación de MPF que activa a la cinasa PIK y a CDC25, induciendo la síntesis de más MPF (autoamplificación), y 3. la inhibición de PKA tiene un rol central, debido a que participa en la activación de la vía Mos/MAPK, estimula la síntesis de novo de ciclina B y la fosforilación de CDC25. El resultado final de la activación del receptor de progesterona es la activación del factor promotor de maduración (MPF), por lo tanto, la maduración del ovocito. Modificada de (Marteil et al., 2009).

Como se muestra en la figura 4, la activación del MPF es necesaria para liberar al ovocito del arresto meiótico (Nader et al., 2016). La inhibición de la enzima adenilato ciclasa está mediada por el dímero G $\beta\gamma$ de una proteína G clásica de tipo inhibitorio, particularmente G $\beta_1\gamma_2$. Se ha observado que la presencia de secuestradores del dímero G $\beta\gamma$ (la subunidad α de la transducina bovina: G α , y la cinasa del receptor β -adrenérgico bovino: β ARK-C $_{caax}$), induce la maduración independiente de

progesterona (figura 5), en contraste, la sobreexpresión del dímero $G\beta\gamma$ inhibe la maduración inducida por progesterona (Sheng et al., 2001, Lutz et al. 2000).

Es importante mencionar que se ha propuesto que el canal GIRK5 podría inducir la maduración del ovocito mediante el secuestro del dímero $G\beta\gamma$ (Díaz-Bello et al., 2013).

Sheng et al. (2001) proponen que existe un GPCR, activo constitutivamente, que regula la liberación de las $G\beta\gamma$ necesarias para mantener el arresto meiótico y que es inhibido por un ligando desconocido, liberado tras la unión de la progesterona con su receptor. Se propone que la progesterona, mediante su acción no genómica, inhibe la liberación del dímero $G\beta\gamma$, por lo tanto, inhibe la síntesis de AMPc (figura 5) e induce la progresión meiótica (Sheng et al. 2001). Sin embargo, la disminución de los niveles de AMPc, tras la inhibición de la adenilato ciclasa, no es suficiente para inducir la maduración del ovocito (Nader et al., 2016).

En resumen, dado que la disminución de los niveles del dímero $G\beta\gamma$ resulta en la maduración del ovocito, pero no así cuando hay una disminución de AMPc, sugiere que $G\beta\gamma$ cumple otra función, aún desconocida, en el proceso de maduración de los ovocitos de *X. laevis* (Sheng et al, 2001); en el laboratorio de la Dra. Escobar, proponemos que el canal GIRK5 podría participar también en dicha vía (figura 5).

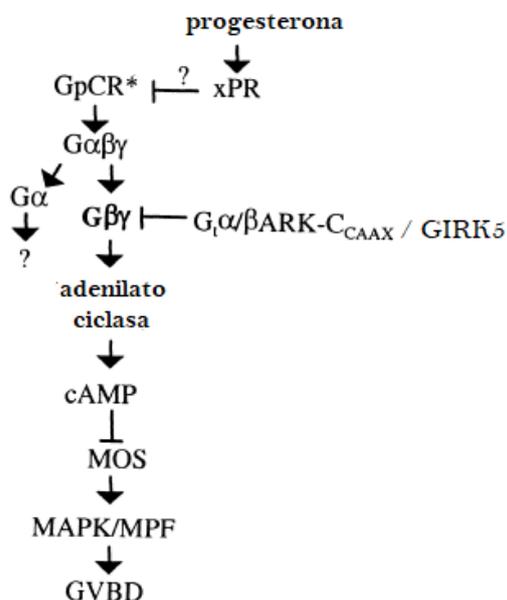


Figura 5: GIRK5 actúa como “secuestrador” de $G\beta\gamma$, lo que favorece la maduración del ovocito independiente de progesterona. Modificada de Sheng et al., 2001.

Participación de canales iónicos en el proceso de maduración

Los ovocitos son células capaces de responder a estímulos modificando sus propiedades eléctricas como consecuencia del flujo de corrientes iónicas a través de canales iónicos en la membrana plasmática (Tosti et al., 2013). Los cambios eléctricos en los ovocitos han sido ampliamente descritos en los procesos de fertilización y maduración. El aumento de Ca^{2+} intracelular, en los ovocitos de *X. laevis* es necesario para poder llevar a cabo los procesos de maduración, fertilización y activación (Tosti, 2006). Durante las etapas tempranas de la maduración en ovocitos de estrella de mar, mediante ensayos electrofisiológicos, se ha observado que las corrientes de potasio incrementan (Moody, 1985), mientras que en ovocitos de erizo de mar ocurre lo contrario, la permeabilidad al ion potasio va disminuyendo conforme avanza la maduración (Dale & de Santis, 1981).

Participación de canales de potasio en el proceso de maduración.

Los canales de K^+ participan en el control de la progresión del ciclo celular tanto a través de su influencia en el potencial de membrana, como de mecanismos no canónicos independientes de la permeación (Urrego et al., 2014). También se sabe que los bloqueadores de los canales de potasio de amplio espectro inhiben a la proliferación celular (DeCoursey et al., 1984).

La expresión de algunos canales iónicos varía durante las etapas del ciclo celular (Urrego et al., 2014), por ejemplo, el arresto de la proliferación de astrocitos en G1/G0 por ácido transretinoico, induce la expresión prematura de corrientes de potasio rectificadoras entrantes (Kir), que típicamente se expresan en astrocitos diferenciados (MacFarlane & Sontheimer, 2000). Otro ejemplo son los canales de potasio regulados por voltaje (Kv) que se expresan en ovocitos de ratón y permanecen activos durante las fases M y G1, pero no durante S y G2, estableciendo el potencial de membrana a lo largo del ciclo celular (Day et al., 1993).

2.4 Fosforilación de canales iónicos

Una de las reacciones bioquímicas más importantes es la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina; además de ser la modificación post-traduccional de proteínas más abundante. La fosforilación de una proteína regula una serie de funciones celulares como el crecimiento y diferenciación celular y la apoptosis. Además de la señalización celular; la fosforilación regula cascadas de señalización, como en la vía de la MAPK, donde se propaga una señal de fosforilación, a través de una cadena de cinasas, para eventualmente activar la transcripción de proteínas.

Por todo lo anterior, la fosforilación aberrante de proteínas está implicada en enfermedades como cáncer. (Singh, et al., 2017, Bilbrough, et al., 2022). La fosforilación de los canales iónicos puede dar lugar a cambios conformacionales que alteren su activación y, por lo tanto, su actividad eléctrica (Ismailov & Benos, 1995).

La fosforilación por proteínas PKA y PKC modula la actividad de canales de sodio, potasio y Ca^{2+} (Mundiña-Weilenmann et al., 1991). La PKA disminuye la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje (Mundiña-Weilenmann et al., 1991) e incrementa la corriente del heterotetrámero GIRK1/GIRK4 (Müllner et al., 2000). De modo similar, la actividad de la PKC regula a la baja a la corriente de sodio registrada en neuronas de ratón (Numann et al., 1991) e inhibe a los canales GIRK, cuando la cinasa se activa con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), a través de la fosforilación de un residuo de serina en la región C terminal (Mao et al., 2004; Takano et al., 1995).

El papel de la fosforilación en el proceso de maduración

La meiosis y la fertilización de los ovocitos son reguladas por diversas cinasas. MPF y MAPK son los principales moduladores del ciclo celular, su estado de activación/inactivación define los pasos de la meiosis, y, a la vez, su actividad está modulada por otras proteínas cinasas (Fan et al., 2002). La cinasa de serina/treonina Mos induce la maduración de los ovocitos mediante la vía de la MAPK; la cinasa dependiente de calmodulina (CaMK II) regula a la baja la actividad del MPF por un mecanismo dependiente de ubiquitina, así mismo, la PKC inhibe a la actividad de la MAPK durante el proceso de maduración y los miembros de la familia

de proteínas cinasas de tirosina (Src) estimulan la liberación de Ca^{2+} intracelular durante el proceso de fertilización, activando al ovulo e impidiendo que sea fecundado por más de un espermatozoide y, posteriormente, dando lugar a la formación del cigoto (Fan et al., 2002, Bates et al., 2014). La cooperación de todas estas cinasas es necesaria para el desarrollo y fertilización de los ovocitos.

Cinasas de tirosina

Para que ocurran los eventos celulares que preceden a los procesos de maduración, fertilización y activación, los ovocitos poseen diversas vías de transducción. El ovocito exhibe una amplia gama de cinasas de tirosina (PTK) que se expresan a niveles más altos, en comparación con otros tipos de células (Hubbard & Till, 2000). La reacción que catalizan las PTK es la transferencia de un grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo de una tirosina de un sustrato proteico. Existen dos tipos de PTKs: los receptores transmembranales (RTK) y los que no son receptores (NRTK). Las RTK son glicoproteínas transmembranales activadas por ligando que traducen señales extracelulares hacia el citoplasma, mediante la fosforilación de residuos de tirosina, activando numerosas vías de señalización y, con ello, eventos como la proliferación celular, la diferenciación, la migración y el metabolismo. Esta familia incluye a receptores de insulina y factores de crecimiento (Hubbard & Till, 2000).

La familia de las NRTKs está compuesta por 8 subfamilias de cinasas (Abl, Zap70, Jak, Btk, Fak, Src, Csk y Fes) que forman parte de las cascadas de señalización desencadenadas por las RTKs y otros receptores, entre ellos, los GPCR. Los miembros de la subfamilia Src participan en una gran variedad de procesos como la mitogénesis y la reestructuración del citoesqueleto; también han sido implicados en distintos tipos de cáncer humano (Hubbard & Till, 2000).

Dentro de la familia de las Src, existe una proteína presente en los ovocitos de *X. laevis* (xSrc) que ha sido asociada a la progresión meiótica, acelerando la maduración de los ovocitos. Representa una de las respuestas más tempranas del ovocito a la progesterona y su activación está acompañada de la activación de la vía de la MAPK. La unión de la progesterona a su receptor activa la vía Src/Ras/MAPK (Tokmakov et al. 2005).

Los ovocitos de *X. laevis* poseen una proteína de la familia Src de 57 kDa y que pertenece a la familia de las cinasas Src (SFK) más abundante en dichas células. Esta cinasa es ampliamente inhibida por la actividad del fármaco sintético PP1 (Hanke, s. f., 1996). PP1 inhibe selectivamente a las cinasas de tirosina Src. En este proyecto se empleará con el propósito de determinar el impacto de la inhibición de cinasas Src en la distribución del canal GIRK5.

2.5 Proteómica

La proteómica se refiere al análisis del conjunto total de proteínas de una célula, tejido u organismo bajo condiciones específicas. Está basada en tres pilares tecnológicos básicos: un método que permita fraccionar proteínas complejas, espectrometría de masas (EM) para poder detectar proteínas individuales y el análisis bioinformático que permite procesar los espectros de masas y determinar la secuencia de proteínas o péptidos que más se asemeje a los datos experimentales. (Yu et al., 2010). Actualmente, la proteómica permite el desarrollo de diversos ensayos como: detección de interacciones proteína-proteína (IPP), análisis de modificaciones post-traduccionales, estudios de localización, etc.

Debido a la gran complejidad que presentan las muestras de proteómica, es necesario realizar una separación previa de las proteínas por cromatografía de líquidos (LC), la cual permite separar analitos que no puedan diferenciarse únicamente por EM, en función de su polaridad. En cuanto a la EM se han desarrollado dos procesos de ionización suave, que permitan transferir péptidos o proteínas no volátiles y térmicamente inestables a la fase gaseosa sin degradar significativamente las muestras: la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (Z. Zhang et al., 2014).

El primer paso del análisis proteómico es la preparación de la muestra, para lo que existen dos métodos distintos: “bottom-up”, en el que, antes del análisis LC-EM, se digieren las proteínas en péptidos (con una enzima como la tripsina) y “top-down”, en el que se analizan proteínas intactas; el método más usado es el “bottom-up. En

cuanto a LC, el tipo más comúnmente usado es la cromatografía de líquidos de fase reversa, debido a la compatibilidad de la fase móvil con MS (Z. Zhang et al., 2014).

Existen dos tipos de proteómica basada en EM: proteómica dirigida y de descubrimiento. Mientras que la proteómica de descubrimiento tiene como objetivo la identificación integral de proteínas en una muestra, la dirigida se basa en el monitoreo de un analito específico en un gran número de muestras (Saleh et al., 2019).

En este trabajo se empleó la metodología de proteómica de descubrimiento para detectar IPP, con una fuente de ionización por electrospray y la preparación de las muestras se llevó a cabo con el método “bottom-up”

Una forma de presentar los resultados del análisis proteómico es mediante el uso de interactomas: conjunto de las interacciones moleculares en un entorno biológico determinado. El interactoma de una proteína representa a las proteínas que interactúan con ella, para promover, regular o inhibir su actividad o expresión; puede incluir también sustratos o componentes moleculares que sean regulados por la proteína de interés. La identificación del interactoma de una proteína puede proporcionar información sobre su función y los mecanismos en los que está involucrada (Maccarrone et al., 2017).

3. Antecedentes

2.1 Canal GIRK5

En el genoma de *X. laevis* existen dos genes parálogos que codifican para el canal GIRK5: uno en el cromosoma 7 largo (Kcnj5.L); y otro en el cromosoma 7 corto (Kcnj5.S) (Rangel-Garcia et al. 2021). El gen Kcnj5.L codifica para tres isoformas, cuya diferencia radica principalmente en la longitud de la región N-terminal: GIRK5 (429 aa), $\Delta 5$ GIRK5 (424 aa) y $\Delta 25$ GIRK5 (404 aa) (Salvador et al., 2001, 2003). La isoforma GIRK5 es la que más ha sido estudiada por ser el canal wild type. Más adelante se discutirá sobre el gen parálogo Kcnj5.S.

El canal GIRK5 además tiene un ortólogo, el canal GIRK4. Esto implica que comparten una secuencia genética similar y una función biológica relacionada, ya que ambos tienen un ancestro común en su origen evolutivo. Sin embargo, debido al proceso de especiación, estos genes divergieron, dando lugar a su expresión en diferentes especies: mamífero (GIRK4) y en la rana *X. laevis* (GIRK5). (Altenhoff, et al., 2019, Rangel-García et al., 2021).

GIRK4 se expresa en células en células de mamífero: corazón, glándulas suprarrenales, páncreas y apéndice; es ampliamente estudiado por su relación con enfermedades como el hiperaldosteronismo (Geller et al., 2008).

Las secuencias de los canales GIRK4 y GIRK5 presentan 82% de identidad; la principal diferencia de sus secuencias es que, comparado con GIRK4, GIRK5 exhibe un extremo amino terminal que contiene 25 aminoácidos adicionales (Hedin et al., 1996); en dicha secuencia se identificó una tirosina fosforilable en la posición 16 (Y16) (Figura 6) (Mora & Escobar, 2005).

liberado del retículo endoplásmico, el canal GIRK5KR es traslocado hacia la membrana plasmática.

Con el propósito de saber si la expresión de GIRK5 en la membrana plasmática es crucial para su participación en el proceso de maduración, se llevará a cabo un ensayo de maduración para ver el efecto de la sobreexpresión del canal GIRK4 en ovocitos de *X. laevis*. El objetivo es determinar si la sobreexpresión de un canal GIRK que se localiza en la membrana plasmática es suficiente para inducir la maduración del ovocito en ausencia de un estímulo hormonal.

Además del motivo de retención de retículo endoplásmico, el canal GIRK5 posee un motivo de polarización (ESPQLI) río abajo de Y16, que permite la distribución del canal GIRK5 hacia el polo animal (ap) (Díaz-Bello et al., 2013). Interrumpir la secuencia del motivo de polarización, permite la distribución del canal en ambos polos ($\Delta 25$ GIRK5) y en el polo animal (GIRK5-Y16A). El canal funcional se expresa en la membrana plasmática del polo vegetal (Díaz-Bello et al., 2013; Rangel-García et al., 2021) (figura 7).

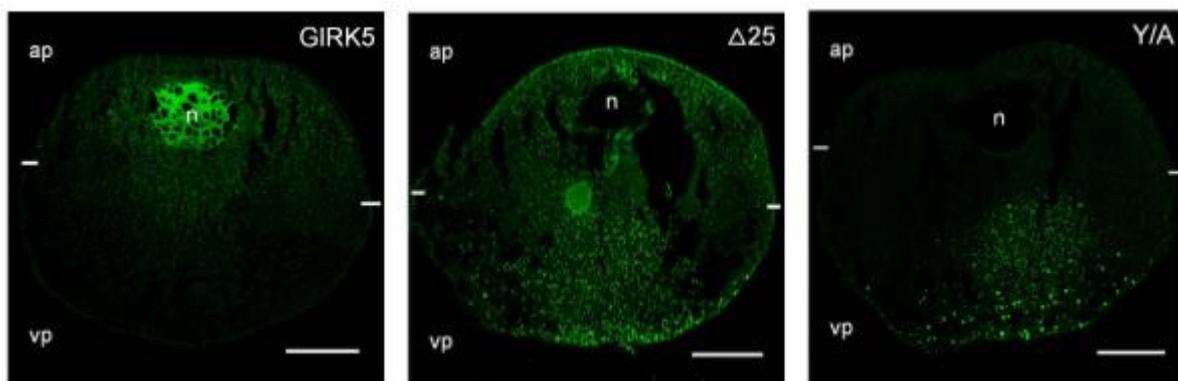


Figura 7 Localización de GIRK5-WT, $\Delta 25$ GIRK5 y GIRK5-Y16A. Imágenes de microscopía confocal de las quimeras EGFP de GIRK5, $\Delta 25$ GIRK5 y GIRK5-Y16A. Modificada de (Díaz-Bello et al., 2013)

Bauer y colaboradores reportaron que la corriente endógena del canal GIRK5 es variable entre los ovocitos de distintas ranas e incluso entre las estaciones del año; en los meses de marzo y mayo se registra una mayor corriente que en los meses de agosto y noviembre (Bauer et al., 1996), lo que implica que la expresión endógena

de GIRK5 responde al ritmo biológico de la rana. Se ha reportado que los estrógenos inducen la expresión de canales iónicos en los ovocitos (Ritchie, 1993).

El nivel de expresión del canal GIRK5 también varía entre los distintos estadios de desarrollo de los ovocitos de *X. laevis* (I-VI); el mayor nivel de expresión de GIRK5 se observa en los primeros tres estadios y durante la maduración inducida con progesterona (Rangel-Garcia et al., 2021).

2.1.1 GIRK5.S

Como se mencionó anteriormente, el gen que codifica para el canal GIRK5 tiene un parálogo, el gen *Kcnj5.S*, la “S” viene de que está localizado en el cromosoma corto. *Kcnj5.S* codifica para el canal GIRK5.S, dicho canal posee una secuencia de 201 aminoácidos, aproximadamente la mitad, con respecto a la secuencia de GIRK5 (Rangel-Garcia et al. 2021). En la figura 8A, se comparan las estructuras de los canales GIRK5, GIRK4 y GIRK5.S. Las tres proteínas pertenecen a la familia de los canales GIRK, por lo que cuentan con dominios que son representativos de dicha familia, así como la región transmembranal y del poro (color morado) y las regiones citoplásmicas, correspondientes al extremo amino (color verde) y el extremo carboxilo (color anaranjado). En la figura 8B se puede observar que la “falta” de aminoácidos en la secuencia de GIRK5.S se ve reflejada principalmente en su corta región C-terminal.

El extremo C-terminal de los canales GIRK es importante para la regulación de su actividad. El canal GIRK1 tiene un C-terminal más largo que el resto de los canales GIRK y cumple la función de regular la actividad del canal inducida por neurotransmisores (Dascal y Kahanovitch 2015), además, el C-terminal de GIRK1 participa en la formación de un sitio de unión de alta afinidad a $G\beta\gamma$ (C.-L. Huang, Jan, y Jan 1997; Dascal y Kahanovitch 2015). Se desconocen las implicaciones biológicas que pueda tener esta diferencia estructural en la actividad de GIRK5.S.

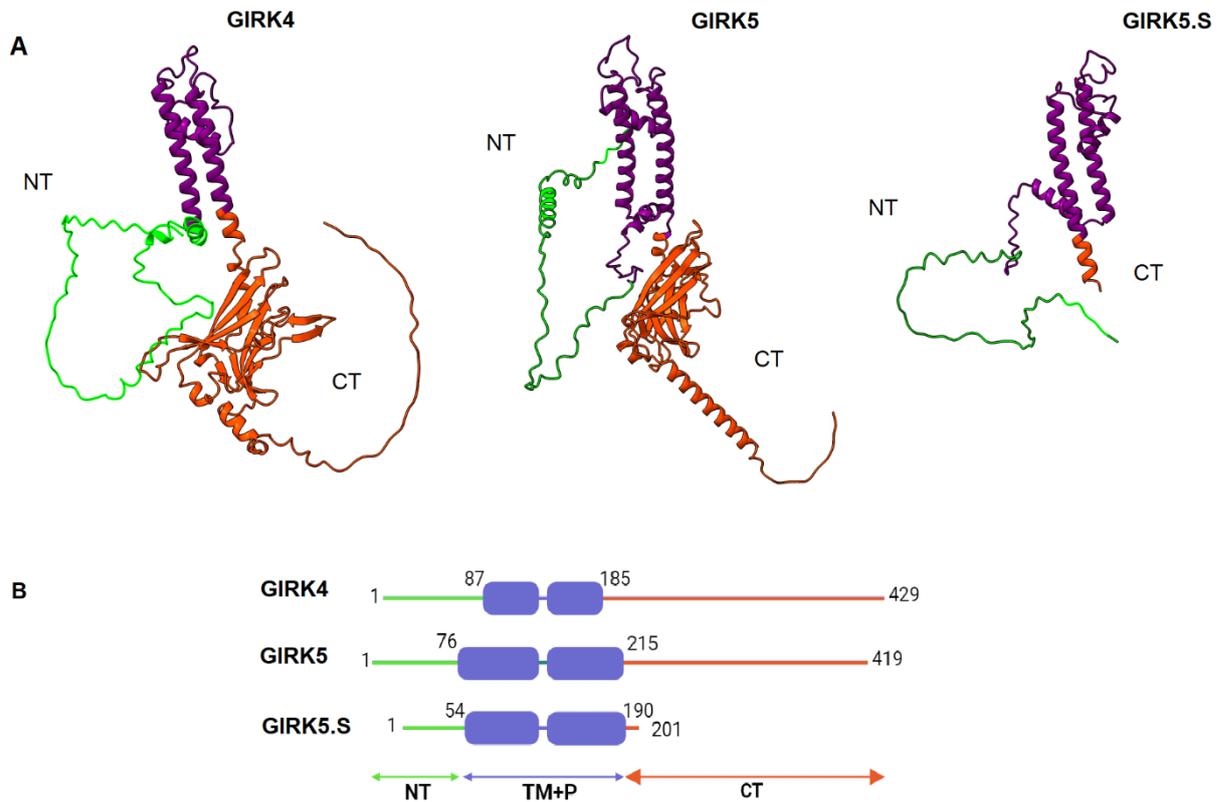


Figura 8. A) Estructura de tres subunidades de canales GIRK: GIRK4, GIRK5 y GIRK5.S. B) Esquema lineal de las subunidades de los canales GIRK4, GIRK5 y GIRK5.S. Se alinearon las secuencias para que la subunidad que corresponde a los segmentos transmembranales y la región del poro (TM+P) coincidan. En color verde se representa el extremo amino terminal; en anaranjado el extremo carboxilo y en morado la región transmembranal y del poro. Los modelos estructurales de la figura A fueron obtenidos de la base de datos del programa AlphaFold, se pueden encontrar con los códigos: AF-P48544-F1 (GIRK4), AF-Q91658-F1 (GIRK5); la estructura de GIRK5.S se predijo por primera vez. La figura B fue construida con los dominios reportados para cada proteína en la base de datos de InterPro.

La secuencia de aminoácidos del canal GIRK5.S presenta 3 aminoácidos continuos (NQD) y tres discontinuos (R, E, T) que pueden ser reconocidos por el anticuerpo anti GIRK4. En la figura 9, se alinean los aminoácidos 6-18 de la secuencia del canal GIRK5.S con la secuencia del epítipo que reconoce el anticuerpo anti-GIRK4 (Alomone). En color rojo se presentan los aminoácidos que tienen en común ambas secuencias.

GIRK5.S	5	R	V	S	I	N	Q	D	L	E	V	D	I	T	19
Epítipo vs GIRK4															

Figura 9: Secuencia de aminoácidos del canal GIRK5.S y epítipo que reconoce el anticuerpo anti GIRK4. En rojo se muestran los aminoácidos que tiene en común GIRK5.S con respecto al epítipo de GIRK4.

Lo anterior nos abre la oportunidad de poder estudiar el canal GIRK5.S endógeno, empleando un anticuerpo comercial. En este trabajo comprobaremos si el anticuerpo anti-GIRK4 nos permite detectar GIRK5.S en el modelo de la rana *Xenopus laevis*, de esta manera, podremos estudiar su distribución.

2.2 Proteómica de canales GIRK.

Previamente en el laboratorio de la Dra. Laura Escobar, obtuve el interactoma del canal GIRK5 recombinante en el ovocito de *X. laevis* (Chávez García, 2021). La muestra que se analizó mediante proteómica fue el inmunoprecipitado (ip) dirigido a la quimera GIRK5-EGFP. Se obtuvo satisfactoriamente el inmunoprecipitado dirigido al canal GIRK5, empleando el anticuerpo anti EGFP y se detectaron, mediante HPLC-masas, 11 proteínas en la muestra, entre ellas: chaperonas (proteínas de choque térmico), proteínas de citoesqueleto (actina), subunidades de la ATP-sintasa, la enzima piruvato cinasa, proteínas ribosomales, una proteína asociada a proliferación (pa2g4) y al canal GIRK5. Se construyó un interactoma en el que no se detectó una IPP directa entre GIRK5 y alguna de las otras proteínas presentes en la muestra. Debido a que se desconoce la vía de participación del canal GIRK5 en la maduración del ovocito, nuestro interés estuvo en determinar su interacción con proteínas relevantes para el proceso de maduración. Entre los resultados obtenidos, la proteína pa2g4 (proteína 2G4 asociada a proliferación), también llamada EBP1, fue la más relevante por su participación en la vía de señalización de ErbB-3, que, a su vez, regula la vía de la MAPK y ERK_{1/2}, ambas vías de gran relevancia para el proceso de maduración de los ovocitos (Black et al., 2019; Seshacharyulu et al., 2012).

Hasta el momento no hemos realizado ningún ensayo funcional para confirmar o descartar alguna interacción entre el canal GIRK5 y las demás proteínas del interactoma, sin embargo, se planean realizar para proyectos posteriores.

Uno de los objetivos de este trabajo fue probar si el anticuerpo anti-GIRK5 es capaz de inmunoprecipitar al canal GIRK5 y posteriormente, analizarlo mediante proteómica para observar las interacciones proteína-proteína en las que participa en

el modelo de ovocito. Anteriormente se ha empleado el anticuerpo anti-GIRK5 para realizar ensayos de Western blot (Rangel-Garcia et al. 2021), obteniendo resultados satisfactorios. Sin embargo, es la primera vez que se emplea en ensayos de inmunoprecipitación.

Para que un anticuerpo sea apto para ensayos de inmunoprecipitación, debe dirigirse a un epítipo conformacional o uno lineal, cuya secuencia se encuentre en los extremos de la proteína, con el fin de que pueda ser detectado en su estado nativo (Abyntek, 2016). La secuencia que reconoce el anticuerpo policlonal que se diseñó para el canal GIRK5 está localizada en el extremo amino terminal y está integrada por los aminoácidos 5 al 22 (figura 10).

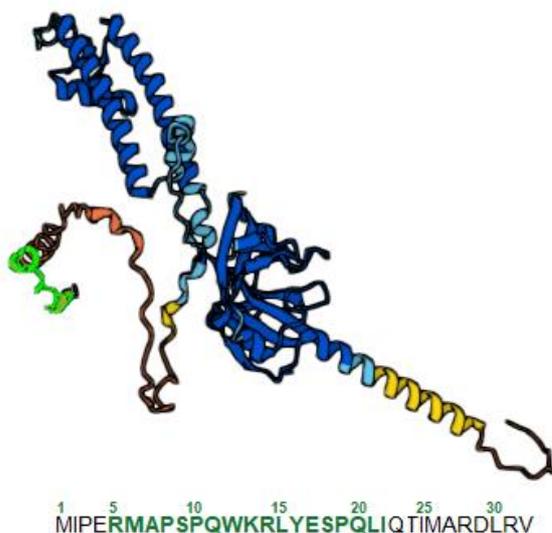


Figura 10: Estructura plegada del canal GIRK5 y secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-GIRK5. En color verde se marca la región, dentro de la estructura, que corresponde al epítipo lineal (aa 5-22 de la secuencia)

Como se puede observar, la interacción antígeno-anticuerpo es propicia, debido a que el epítipo está en una región muy accesible del N-terminal.

Teóricamente, el anticuerpo anti-GIRK5 sirve tanto para ensayos que requieran la desnaturalización de la proteína (Western blot), como para ensayos en los que la proteína se encuentre en su estado nativo, como es la inmunoprecipitación.

4. Justificación

El canal GIRK5 se expresa endógenamente en los ovocitos de la rana *X. laevis*. Hasta el momento, se dispone de poca información sobre su papel fisiológico en los ovocitos, sin embargo, se conoce que su distribución celular depende de su estado de fosforilación, y que está implicado en el proceso de maduración de los ovocitos. No se ha reportado la participación de un canal GIRK en el proceso de maduración independiente de progesterona. Es por ello que resulta importante estudiar su función y las proteínas con las que interactúa en el modelo de ovocito, para poder comprender la vía de señalización en la que participa.

5. Hipótesis

Si el canal GIRK4 se expresa funcionalmente en la membrana plasmática, inducirá el proceso de maduración de los ovocitos de la rana *X. laevis*, en ausencia de un estímulo hormonal externo.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar las propiedades funcionales de los canales iónicos GIRK4 y GIRK5, así como su interacción con otras proteínas y distribución celular en el modelo de *X. laevis*.

6.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el impacto de la sobreexpresión del canal GIRK4 en el proceso de maduración de ovocitos de *X. laevis*.
2. Caracterizar la distribución de los canales GIRK5 y GIRK5.S en diversos tejidos de la rana *X. laevis*.
3. Comprobar si el anticuerpo anti-GIRK5 es apto para ensayos de inmunoprecipitación.
4. Inmunoprecipitar a los canales GIRK4 y GIRK5 a partir de lisados de ovocitos que sobreexpresan dichas proteínas.
5. Identificar y caracterizar los interactomas de los canales GIRK4 y GIRK5.
6. Investigar el efecto del inhibidor de cinasas de tirosina PP1 en la distribución subcelular del canal GIRK5

7. Metodología

De acuerdo con los objetivos particulares mencionados, a continuación, se describe la metodología empleada. En la sección “Apéndice” se pueden consultar los detalles de las metodologías y la preparación de las soluciones empleadas.

7.1 Obtención y manejo de ovocitos

El modelo de estudio empleado en este trabajo fue la rana hembra *X. laevis*, así como sus ovocitos; a continuación, se redacta la obtención y el manejo que se les dio.

Ovariectomía parcial

La extracción de ovocitos en estadio V-VI de crecimiento, se realizó mediante ovariectomía parcial, esto es, la extirpación quirúrgica parcial de los ovarios de la rana, para poder tener acceso a los folículos ováricos.

Se anestesió una rana hembra adulta por inmersión en triclaína al 0.2%, durante 15 minutos. Una vez que se verificó que estaba dormida, se colocó en posición dorsal sobre una cama de hielo. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica de aproximadamente 1 cm en la región ventral del abdomen para exponer los ovarios, seguida por la cuidadosa separación de los tejidos circundantes. Una vez identificados, se procedió a extirpar parcialmente la porción de los folículos ováricos. Por último, se suturó la incisión, se aplicó una solución antiséptica y se colocó a la rana en aislamiento en una pecera limpia.

Manipulación de ovocitos

Para preservar la integridad y viabilidad de los ovocitos extraídos, se realizaron las siguientes medidas de cuidado:

Se retiró el folículo que rodea a los ovocitos, mediante una digestión enzimática con una solución 2 mg/ mL de colagenasa tipo 1 (SCR103, Sigma-Aldrich), en medio

ND96 sin Ca^{2+} (96 mM cloruro de sodio, 2 mM cloruro de potasio, 1 mM cloruro de magnesio, 5 mM HEPES, 2.5 mM piruvato de sodio, pH 7.4), durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de digestión, se realizaron 5 lavados con medio ND96 sin Ca^{2+} , para remover la colagenasa remanente; posteriormente, 5 lavados con medio ND96 con Ca^{2+} (96 mM cloruro de sodio, 2 mM cloruro de potasio, 1 mM cloruro de magnesio, 5 mM HEPES, 2.5 mM piruvato de sodio, 1.8 mM cloruro de Ca^{2+} , pH 7.4) y, por último, 5 lavados con ND96 con Ca^{2+} más antibiótico (gentamicina 0.05 mg/mL). Se clasificaron los ovocitos obtenidos por tamaño y se seleccionaron los más grandes, que corresponden a los últimos estadios de crecimiento (V-VI). Los ovocitos se mantuvieron en medio ND96 adicionado con Ca^{2+} + gentamicina a 18°C hasta su posterior uso.

Microinyección de mRNA en ovocitos

Se inyectaron 50 nL solución de mRNA en medio TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) por ovocito (25 ng de mRNA), mediante el uso de un manipulador y un microinyector manual. Los ovocitos inyectados se mantuvieron a 18°C en medio ND96 con Ca^{2+} adicionado con el antibiótico gentamicina (1.250 mg/L) durante 3 días para permitir la traducción del RNA inyectado.

Lisado celular

En este proyecto, se emplearon muestras de membranas totales para analizar el conjunto de proteínas presentes en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Después de la microinyección y transcurridos tres días para permitir la expresión de proteínas, se lisaron las células. Se preparó buffer de extracción de proteínas (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, trisaminometano 1 mM). Se colocaron los ovocitos en un tubo Eppendorf de 3 mL sin medio y se agregaron 5 μL de buffer de extracción de proteínas por ovocito. Empleando una aguja hipodérmica 30G, se perforaron los ovocitos en el tubo de recolección, pasándolos 20 veces por la jeringa. Posteriormente se incubó el tubo de lisado en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional. Terminada la incubación, se centrifugó el tubo de recolección a 200 rcf (Relative Centrifugal Force) durante 5 min a 4°C, por duplicado, separando

el sobrenadante a un tubo nuevo cada vez. Terminado el ciclo de centrifugación a 200 rcf, se centrifugó el sobrenadante recuperado a 14,000 rcf durante 20 min a 4°C. Por último, se colocó el sobrenadante final en un tubo de 600 µL, se ajustó su volumen a 0.5 mL con buffer de extracción de proteínas y se almacenó a -20°C.

Determinación de la concentración de proteínas (Método Lowry)

Se realizó una curva de calibración con albúmina en SSI (solución salina isotónica) en un rango de concentraciones de 0.06 a 2 mg/mL. Se prepararon dos diluciones de la muestra (1:10 y 1:20) y se utilizó el kit BioRad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del proveedor. Se leyó la absorbancia de la muestra a 750 nm, usando un espectrómetro UV y se calculó la concentración de proteínas presentes en el lisado celular.

7.2 Registro electrofisiológico de las corrientes entrantes de potasio en los ovocitos

Previo al ensayo de maduración de ovocitos que sobreexpresan el canal GIRK4, se verificó que los ovocitos realmente expresaban el canal en la membrana plasmática, mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC). Se inyectó un grupo de ovocitos con 23 ng de RNA del canal GIRK4. Tres días después de la inyección, se registraron los ovocitos con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp). Se utilizó un convertidor analógico digital (DIGIDATA 1550B, Molecular Devices), un amplificador (Axoclamp 900A, Molecular Devices). Se utilizó el software Clampex10.6 (Molecular Devices) para la adquisición de datos y producción de los registros. Las corrientes totales se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de 12 pulsos, cada uno con una duración de 100 ms a un potencial de mantenimiento de 0 mV. Los pasos de voltaje aplicador fueron de -160 a +60 mV. Los ovocitos se registraron con dos microelectrodos con resistencias de 0.5 a 1.5 MΩ. Las pipetas de registro se llenaron con una solución 3 M de KCl. Se empleó una solución alta en potasio como medio de registro (mM: 118 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, Ph 7.4). La

adquisición de datos y el análisis de los registros se realizaron con el software pClamp 11.0.

7.3 Ensayo de maduración

El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sobreexpresión del canal GIRK4 en la maduración de los ovocitos de *X. laevis*. La muestra de estudio fue un grupo de ovocitos que sobreexpresan al canal GIRK4; como controles positivos se usarán ovocitos que sobreexpresan GIRK5 y la mutante GIRK5-K13AR14A; el control negativo serán ovocitos inyectados con agua.

Preparación de muestra y controles

Se obtuvieron ovocitos en estadios V-VI, como se indicó en el apartado “obtención y manejo de ovocitos”. Se inyectaron grupos de 40 ovocitos con 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de mRNA de los canales GIRK5, GIRK4 y la mutante GIRK5-K13AR14A y se dejaron expresando durante tres días, adicionalmente se inyectó un grupo de 40 ovocitos solo con agua (control negativo). El segundo día después de la extracción de ovocitos, se separó un grupo de 40 ovocitos no inyectados y se incubaron durante 12 horas en medio ND96 sin Ca^{2+} , adicionado con 10 μM de progesterona (P0130 Sigma-Aldrich), para estimular su maduración (control positivo), procurando que el tiempo de incubación terminara a la par de las 72 horas de expresión de los ovocitos inyectados. Cumplidas las 72 horas, se lisaron todos los grupos de ovocitos, como se indica en el apartado “lisado celular”; por último, se determinó la concentración de proteína en los lisados celulares obtenidos.

Electroforesis y análisis por Western Blot

Todos los grupos anteriormente mencionados fueron analizados mediante western blot, para detectar la presencia del marcador de maduración p-Erk1/2, empleando el anticuerpo primario anti-p-Erk1/2 (sc-81492) a una dilución de 1:200 y el anticuerpo secundario donkey anti-mouse (AB_2340758, Jackson InmunoResearch) en dilución 1:25,000. Se mezcló el equivalente a 30 μg de proteína de lisado con el mismo volumen de buffer de carga (Laemmli, Bio-Rad) adicionado con 5% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad) y se incubó a 95°C durante 5 min. Posteriormente se

separaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 10%, junto con 5 μ L de marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo usando buffer SDS-Tris-glicina (ver apéndice) a 120 V (gel concentrador) y 150 V (gel separador). Al finalizar la electroforesis, se realizó la transferencia semiseca de las proteínas a una membrana de PVDF (Immuno Blot PVDF membrane for protein blotting), a 10 V durante una hora. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween 0.1% (TBS-T, ver apéndice) y se bloqueó con solución de bloqueo (ver apéndice), durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de una hora, se retiró la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente, durante 18 horas a 4°C con agitación lenta. Una vez terminado el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora, con leve agitación a temperatura ambiente. Finalmente se reveló la membrana, usando el kit de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad), en un fotodocumentador (UVP ChemStudio).

7.4 Distribución de los canales GIRK5 y GIRK5.S en distintos órganos de la rana *Xenopus laevis*

Como se mencionó anteriormente, el canal GIRK5 fue identificado en los ovocitos de *X. laevis* (Weber, 1999). Sin embargo, se desconoce si se encuentra en algún otro tejido de la rana. Por otro lado, aún no ha sido caracterizada la distribución del canal GIRK5.S en el modelo de *X. laevis*.

Con el objetivo de comprobar si es posible detectar al canal GIRK5.S, empleando el anticuerpo anti-GIRK4, e identificar la localización de los canales GIRK5 y GIRK5.S en distintos órganos de la rana *X. laevis*, se extrajeron: ovocitos, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, intestino y oviductos de tres ranas *X. laevis* hembra adultas. Posteriormente, se lisaron los órganos extraídos y se prepararon las muestras para ser analizadas mediante western blot.

Se sacrificaron 3 ranas hembra adultas *X. laevis* empleando el método químico de inmersión en metanosulfonato de tricaína 0.2 mg/mL (E10521, Sigma-Aldrich)

durante 30 minutos y confirmando con el método físico de hipotermia durante 1 hora. Se colocó a la rana en posición dorsal y se realizó una incisión a lo largo del dorso de la rana, comenzando desde la región posterior y extendiéndola hacia adelante hasta la región craneal, posteriormente se abrió cuidadosamente la cavidad abdominal para exponer los órganos internos y se extrajeron los órganos de interés. Se colocaron los órganos extraídos en un recipiente limpio y etiquetado con el nombre del órgano y la rana de origen. Se lisaron los órganos empleando un taladro homogeneizador y 1 mL de buffer de lisis (ver anexo) por cada 100 mg de muestra. Se cuantificó la concentración de proteína como se indica en los apartados “Lisis celular” y “Determinación de la concentración de proteínas” del numeral 7.1 de este trabajo. Por último, se analizaron los lisados de órganos mediante western blot, con el objetivo de detectar la presencia de los canales GIRK5 y GIRK5.S. Para la identificación del canal GIRK5 se empleó el anticuerpo anti-GIRK5 en una dilución 1:3,500; el canal GIRK5.S se detectó empleando el anticuerpo anti-GIRK4 (APC-027 Alomone) 1:200; en ambos casos se utilizó el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit (AB_10015282 Jackson InmunoResearch) 1:25,000.

7.5 Obtención de interactomas

Debido a la inexistencia de un anticuerpo comercial dirigido para el canal GIRK5, se produjo el anticuerpo policlonal anti-GIRK5, en colaboración con el Dr. Vianney Ortiz (Departamento de biomedicina molecular, CINVESTAV). En la figura 11 se presenta la secuencia que fue empleada como epítipo.

GIRK5 MIPERM**APSPQWKRLYESPQL**IQTIMARDLRVSMNQDLKV 41

Figura 11. Aminoácidos (aa) 1-40 de la secuencia de canal GIRK5. En color rojo se resalta la secuencia (aa 5-21) utilizada como antígeno para la generación del anticuerpo policlonal anti-GIRK5. Datos obtenidos de la base de datos UniProt, código de proteína “Q91658_XENLA”

Previamente se ha empleado el anticuerpo anti-GIRK5 en ensayos de western blot para detectar al canal GIRK5 recombinante y endógeno (Rangel-Garcia et al., 2021). Con el objetivo de evaluar la capacidad del anticuerpo anti-GIRK5 para

inmunoprecipitar al canal GIRK5 recombinante, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación utilizando lisados de ovocitos que sobreexpresaban el canal GIRK5. Adicionalmente, se realizó el mismo ensayo utilizando el anticuerpo anti-GIRK4 (Alomone) en ovocitos que sobreexpresaban el canal GIRK4.

Posteriormente, se realizó un análisis proteómico de los inmunoprecipitados obtenidos para identificar las proteínas co-inmunoprecipitadas con los canales GIRK5 y GIRK4, las cuales podrían interactuar potencialmente con ellos.

A continuación, se detalla la metodología empleada:

Inmunoprecipitación

Se resuspendieron y transfirieron 50 μL de perlas magnéticas (Dynabeads protein G, Invitrogen) a un tubo de 600 μL y se lavaron por duplicado con 200 μL de PBST (tubo 1). Se diluyó el equivalente a 5 μg de anticuerpo (tabla 1), en 200 μL de buffer de lavado (PBS pH 7.4 con 0.02% de tween), y se agregó la dilución al tubo 1. Posteriormente se incubó con rotación constante durante 1 hora a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tabla 1: cantidad de anticuerpo utilizado para el ensayo de ip.

Anticuerpo	Detalles	concentración	Volumen empleado	Concentración final
Anti-GIRK5	Rabbit Policlonal	0.43 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$	11.62 μL	5 $\mu\text{g} / 200 \mu\text{L}$
Anti-GIRK4	Alomone APC-027 Rabbit Policlonal	0.8 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$	6.25 μL	5 $\mu\text{g} / 200 \mu\text{L}$

Pasado el tiempo de incubación, se retuvieron las perlas con un imán y se retiró el sobrenadante (Sn1, guardar). Se lavaron las perlas por triplicado con 200 μL de buffer de lavado (PBS pH 7.4 + tween 20 al 0.02%).

Para continuar con la inmunoprecipitación, se agregó el volumen equivalente a 2 mg de lisado celular al tubo 1 y se incubó con rotación por 1.20 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se retuvieron las perlas con un imán y se retiró el sobrenadante (Sn2, guardar).

Se lavó el inmunoprecipitado obtenido (ip) con 200 μ L de buffer de lavado por triplicado, se resuspendió en 100 μ L del mismo buffer y se transfirió a un tubo nuevo (tubo 2).

Elución desnaturalizante:

Se retiró el buffer de lavado del tubo, se agregaron 20 μ L de buffer de elución (50 mM de glicina pH 2.8) y 10 μ L de NUPAGE LSD sample buffer (Thermofisher) a temperatura ambiente y se calentó por 10 min a 70°C. Se retiraron las perlas y se procedió a concentrar las muestras en un gel de electroforesis.

Electroforesis:

Para analizar los inmunoprecipitados obtenidos por espectrometría de masas, se optó por hacerlo mediante la extracción de las muestras a partir de un gel de poliacrilamida. Se cargaron los 30 μ L finales de muestra en un gel NuPAGE 10% Bis-Tris de 1 mm de espesor (Thermofisher) y se realizó la electroforesis a 150 V, en una cámara XCell SureLock Mini-Cell (Thermofisher), hasta que las muestra avanzaron 1 cm dentro del gel. Se usó MOPS SDS Running Buffer 1X (Thermofisher). Se tiñó el gel con azul de coomassie (Bio-safe Coomassie G-250, Bio-Rad).

Esta metodología se aplicó tanto a las muestras de ovocitos inyectados con GIRK5 como con GIRK4. Ambos inmunoprecipitados se corrieron en el mismo gel.

Ensayo proteómico

El ensayo proteómico lo realizó el M. en C. Emmanuel Ríos Castro, en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV Zacatenco, Instituto Politécnico Nacional.

En la figura 12 se resume la estrategia general que se empleó.

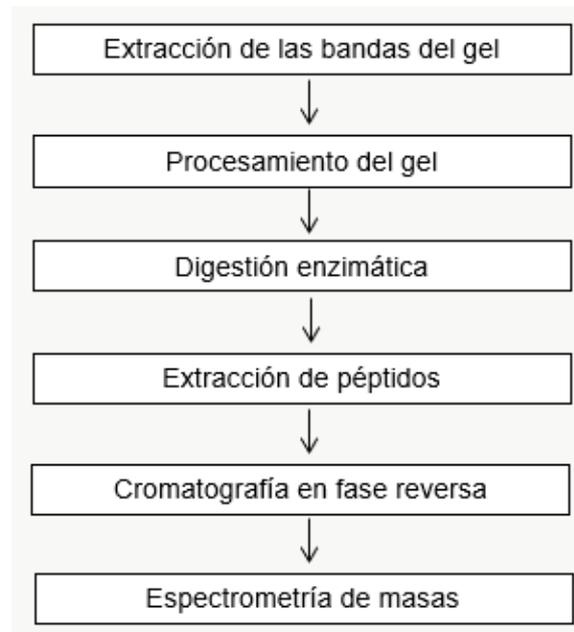


Figura 12. Resumen de la estrategia proteómica que se realizó con las muestras obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación. Los pasos mencionados los realizó el M. en C. Emmanuel Ríos Castro, en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV Zacatenco, Instituto Politécnico Nacional.

A continuación, se describe detalladamente la metodología:

Se cortaron las bandas teñidas del gel de poliacrilamida, correspondientes al inmunoprecipitado de los canales GIRK5 y GIRK4 y posteriormente se destiñeron con solución de desteñido (50% metanol y 2.5% ácido fórmico en agua grado HPLC) y se deshidrataron con acetonitrilo (ACN). Para reducir las proteínas, se trataron las muestras con ditioneitol (DTT) 100 mM y con iodoacetamida (IAA) 50 mM para mantener las estructuras proteicas lineales. Se realizaron una serie de lavados con bicarbonato de amonio (ABC) 100 mM y después se deshidrataron los geles nuevamente con ACN, el ACN restante se evaporó en un concentrador Speedvac.

Para digerir las proteínas se incubaron las muestras con 20 ng/μL de tripsina y ABC 50 mM a 37°C durante toda la noche, dando lugar a la formación de péptidos con lisina o arginina en el extremo carboxilo. Después de la digestión enzimática, se agregó una solución de ácido fórmico al 5% en agua HPLC para inactivar a la

tripsina y una solución de ácido fórmico 5% y acetonitrilo 50% en agua HPLC para extraer los péptidos del gel. Se separaron los restos de gel y el sobrenadante se concentró hasta 20 µL. Finalmente, se desalaron las muestras en una columna C-18 (Pierce C-18 spin column, Thermo Scientific) y se eluyeron los péptidos con 50:50 agua: metanol y ACN 5%. Las muestras recolectadas se concentraron hasta 20 µL.

Se inyectaron 4.5 µL de las muestras en una pre-columna Symmetry C18 Trap V/M (Waters, Milford, MA), utilizando como fase móvil A 0.1 % de ácido fórmico en agua y fase móvil B 0.1% de ácido fórmico en ACN. Los péptidos se separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA).

Se utilizó un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y separación de movilidad iónica Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA), los espectros obtenidos fueron analizados usando el programa ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 software 2 (Waters, Milford, MA) contra la base de datos de *X. laevis*.

Finalizado el análisis, el M. en C. Emmanuel Castro nos proporcionó una hoja de datos con la lista de los nombres de todas las proteínas que fueron detectadas en los inmunoprecipitados, así como su gen, descripción y código de acceso.

El primer paso para el análisis de los datos obtenidos fue la eliminación de las proteínas que fueron detectadas con menos de 95% de confiabilidad y las que fueron leídas al revés. Posteriormente, se confirmó que las proteínas obtenidas estuvieran contenidas en el genoma de *X. laevis*, ingresando los códigos de cada proteína en el buscador de InterPro.

7.6 Efecto del inhibidor PP1 en la localización del canal GIRK5

Las pirazolopirimidinas, como PP1 y PP2, son compuestos sintéticos conocidos por su preferente inhibición de las cinasas pertenecientes a la familia SFK, tales como Src, Fyn, Yes, Lck, entre otras (Tokmakov et al. 2005).

Como se mencionó en los antecedentes, la traslocación del canal GIRK5 desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática está vinculada con la defosforilación del aminoácido Y16 (Mora & Escobar, 2005); con el objetivo de determinar si la fosforilación de la Y16 del canal GIRK5 es mediada por una cinasa de la familia Src. A continuación, se describe la metodología empleada:

Se inyectaron ovocitos con el mRNA de la quimera EGFP-GIRK5, 5 horas después de ser extraídos y fueron divididos en 6 grupos de 30 ovocitos cada uno, como se presenta en la tabla 2; 24 horas después de la inyección, los grupos 1-3 fueron incubados durante una hora con el vehículo DMSO (grupos control) y los grupos 4-6 fueron incubados con PP1 10 mM. Transcurrido el tiempo de incubación los ovocitos se mantuvieron en ND96 adicionado con Ca^{2+} , hasta las 24, 48 o 72 h, según corresponda, para, posteriormente, ser fijados.

Tabla 2: Grupos de estudio y condiciones a las que fueron sometidos los ovocitos, en su preparación para el posterior ensayo de microscopía confocal.

Grupos	Condición de fijación	Tiempo de expresión del canal
1 y 4	24 horas post incubación	24 horas
2 y 5	48 horas post incubación	48 horas
3 y 6	72 horas post incubación	72 horas

Corte histológico

Los ovocitos fueron incubados en una solución de ND96 con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos y posteriormente en paraformaldehído al 2% durante toda la noche. Al siguiente día, los ovocitos se mantienen en paraformaldehído al 2% más sacarosa al 30%, en oscuridad y a 4°C.

Se realizaron cortes sagitales del ovocito con ayuda de un criostato (Leica CM1100). Los ovocitos se cubrieron con medio de congelamiento Tissue-Tek (alcohol polivinílico 10.24% y glicol polietileno 4.26%) y se congelaron hasta alcanzar -25°C

de temperatura. Se realizaron cortes seriados de 10 μm de espesor y se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Las preparaciones se montaron con VECTASHIELD (Vector Laboratories, CA, EUA) para conservar la fluorescencia.

Microscopía confocal

Los cortes se observaron en el microscopio confocal (Zeiss LSM 880), utilizando un objetivo 10x y un láser de argón para detectar al canal GIRK5 marcado con la EGFP (488 nm).

8. Resultados y discusión.

8.1 Expresión funcional del canal GIRK4 en el ovocito

Con el objetivo de determinar si el canal GIRK4 se expresa funcionalmente en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*, se registraron las corrientes rectificadoras entrantes en ovocitos inyectados con el RNA de GIRK4 y ovocitos sin inyectar que expresan al canal GIRK5 endógeno. Los resultados de la inyección del cRNA del canal GIRK4 se compararon con los registros de las corrientes generadas por el canal GIRK5 endógeno.

El protocolo de voltaje para el registro de las corrientes iónicas consistió en 12 pulsos con incrementos de 20 mV, desde voltajes hiperpolarizantes (-160 mV) a voltajes despolarizantes (+60 mV). La duración de cada pulso fue de 100 ms y el potencial de mantenimiento se fijó en 0 mV (figura 12).

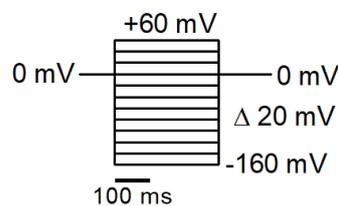


Figura 12. Protocolo de pulsos de voltaje empleado.

Se utilizó una solución alta en potasio (118 mM KCl) como medio de registro. En estas condiciones el valor del potencial de reposo es cercano a cero, valor que se fijó como potencial de mantenimiento. El objetivo de tener una solución alta en potasio es para que las corrientes de potasio que se registran a través de los canales GIRK sean grandes (mA). La rectificación de los canales GIRK es entrante porque no hay corrientes por arriba del potencial de equilibrio del potasio.

En la figura 13 se presentan las gráficas de las corrientes registradas de GIRK4 recombinante (color negro) y GIRK5 endógeno (color rojo). Se puede observar que ambos canales presentan corrientes rectificadoras entrantes (B y D), con cinéticas de activación distintas (A y C). Como era de esperar, la sobreexpresión de GIRK4 generó mayores corrientes entrantes que los canales GIRK5 endógenos (E). Estos resultados indican que ambos canales se expresan funcionalmente.

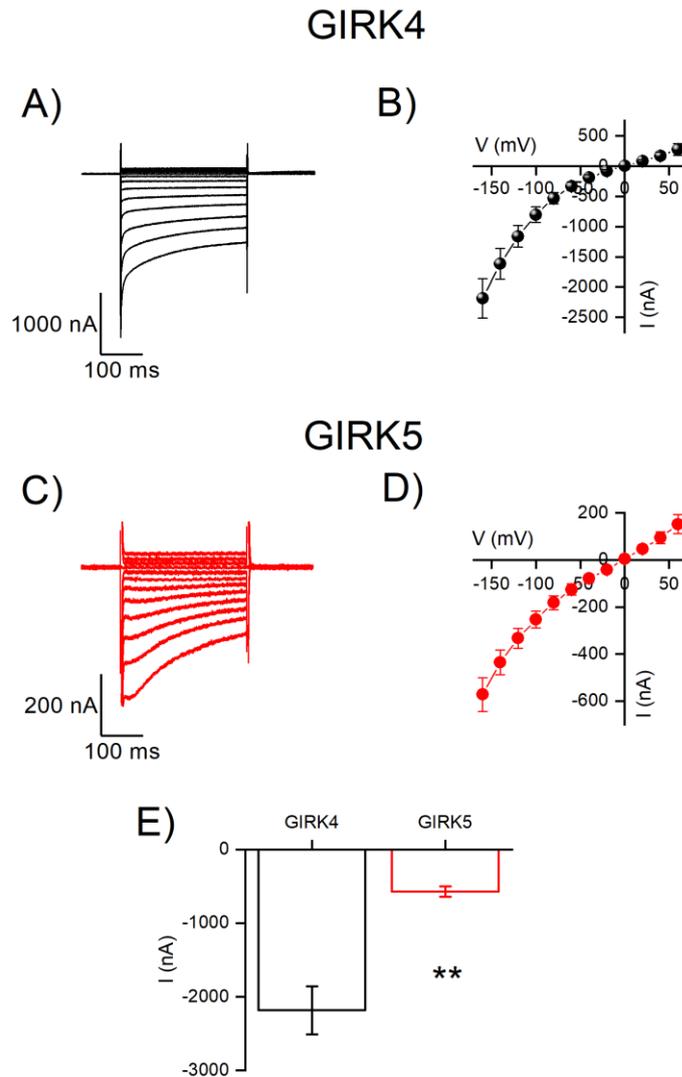


Figura 13. Expresión del canal GIRK4 recombinante y el canal GIRK5 endógeno. A) y C) son registros representativos de las corrientes registradas de los canales GIRK4 recombinante y GIRK5 endógeno, expresados en ovocitos de *X. laevis*. B) y D) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de los canales GIRK4 y GIRK5, respectivamente. E) Comparación de las corrientes entrantes de los canales GIRK4 (barra negra) y GIRK5 (barra roja), determinadas al voltaje más hiperpolarizante de -160 mV. Las barras son representadas como el promedio \pm error estándar. El número de experimentos independientes fue de $n=5$. La prueba estadística empleada fue una prueba t no pareada ** $p < 0.01$. Los resultados se obtuvieron empleando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, en una solución de registro de 118 mM de K^+ . Los registros se realizaron tres días después de la microinyección. Las gráficas se obtuvieron empleando los programas Clampfit 11.2 y OriginLab 2018.

8.2 Efecto de la sobreexpresión del canal GIRK4 en la maduración del ovocito

En antecedentes, se mencionó que la sobreexpresión de la doble mutante GIRK5KR acelera el proceso de maduración de los ovocitos de *X. laevis*, en ausencia del estímulo de la hormona progesterona, no así el canal GIRK5 endógeno (Rangel-García et al., 2021); aún se desconoce el mecanismo. Con el objeto de saber si, la localización de los canales GIRK en la membrana plasmática, es suficiente para inducir la maduración del ovocito, se llevó a cabo un ensayo empleando ovocitos que sobreexpresan GIRK4, que como vimos en el numeral 8.1 de resultados de este trabajo, se expresa funcionalmente. Se analizó mediante western blot la presencia del marcador de maduración p-ERK1/2.

Las muestras empleadas fueron de lisados celulares de ovocitos en estadios V-VI que sobreexpresan canales recombinantes GIRK4. Como control positivo se utilizaron el lisado celular de ovocitos maduros que presentaron la GVBD después de ser incubados en progesterona (p4) 10 μ M, y el lisado de ovocitos que sobreexpresan la doble mutante GIRK5KR. Como controles negativos se emplearon lisados de ovocitos que sobreexpresan el canal GIRK5, que ha sido reportado que no inducen la maduración (Rangel-García et al., 2021), y ovocitos inyectados con agua.

Las ranas *X. laevis* sufren cambios en su ciclo hormonal a lo largo del año; su etapa de reproducción depende de la temperatura ambiental y la disponibilidad de alimento, por lo que, primavera y verano son estaciones en las que presentan altos niveles de hormona luteinizante y hormona folículo estimulante, necesarios para el apareamiento; en contraste, durante otoño e invierno los niveles de hormonas disminuyen y las ranas entran en una especie de hibernación (Álvarez-Romero, et al., 2005). Algunos autores sugieren que la actividad de los canales Kir en ovocitos de *X. laevis* depende de dichas variaciones en el ciclo hormonal (Lewis et al., 1991; Bauer et al., 1996); por lo tanto, se analizaron en total 5 ranas, en distintos meses del año (abril, octubre, enero y marzo), para poder comparar entre las 4 estaciones del año.

En los resultados únicamente se reportan los ensayos en los que se obtuvieron correctamente los controles, realizados en octubre (figura 14A) y marzo (figura 14B).

Como se puede observar en la figura 14, el marcador de maduración p-Erk1/2 solo fue detectado en los controles positivos de ovocitos incubados con progesterona (p4) y ovocitos que sobreexpresaban la doble mutante GIRK5KR, para ambas ranas.

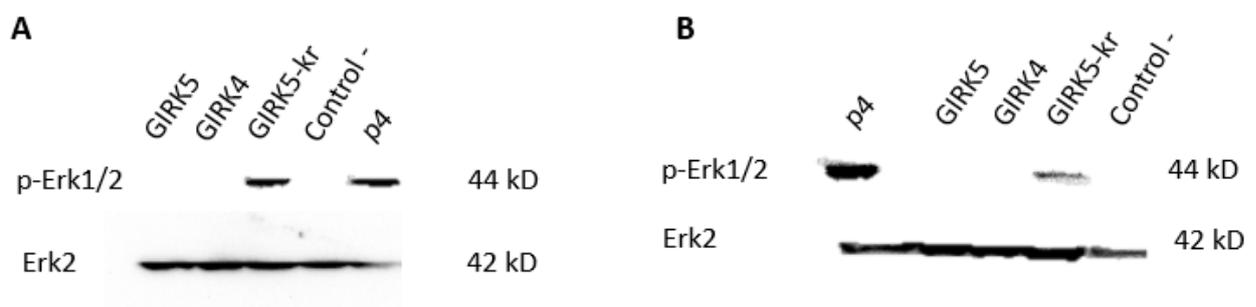


Figura 14. Análisis de western blot para la detección del marcador pERK1/2 en las muestras del ensayo de maduración. **A)** ensayo realizado en el mes de octubre, **B)** ensayo realizado en el mes de marzo.

Con los resultados obtenidos, confirmamos que la sobreexpresión del canal GIRK5 no induce la maduración del ovocito, a pesar de expresarse funcionalmente (figura 13). La única forma en que el canal GIRK5 induce la maduración es cuando se “rompe” el motivo de retención en el retículo endoplásmico (mutación GIRK5KR); por otro lado, se concluye que la sobreexpresión del canal GIRK4 no induce la maduración de los ovocitos de *X. laevis* independiente de progesterona.

Como se reporta en la figura 13, ambos canales (GIRK5 y GIRK4) se expresan funcionalmente en la membrana, pero, dado que su sobreexpresión parece no influir en la maduración del ovocito, a pesar de su localización, en contraste con la mutante GIRK5KR que también se expresa en membrana plasmática, pero que sí induce la maduración del ovocito, se concluye que la participación de GIRK5 en la maduración del ovocito no depende únicamente de su presencia en la membrana plasmática.

Debido a los resultados obtenidos, surge la hipótesis de que el extremo N-terminal de GIRK5 podría ser determinante en su función, específicamente el motivo de retención de RE, debido a que cuando se altera el motivo de retención, no solo permite la expresión funcional del canal, sino, también acentúa su participación en la maduración del ovocito. Para confirmar esta hipótesis, sería pertinente repetir el ensayo de maduración utilizando ovocitos que sobreexpresan la isoforma $\Delta 25$ GIRK5, la cual carece de los primeros 25 aminoácidos del extremo N terminal, por tanto, no presenta motivo de retención y se expresa en membrana plasmática (Salvador, 2001). Si la sobreexpresión de la isoforma $\Delta 25$ GIRK5 no induce la maduración de los ovocitos, sugiere que el N-terminal del canal GIRK5 es esencial para su actividad y su papel en el proceso de maduración.

Si la hipótesis anterior se cumple, surge una nueva: la participación del canal GIRK5 en la maduración es mediante el “secuestro” del dímero $G\beta\gamma$ (Díaz-Bello et al., 2013). Los secuestradores de $G\beta\gamma$ son reguladores de las vías mediadas por GPCR; un ejemplo de secuestrador de $G\beta\gamma$ es la cinasa del receptor β -adrenérgico (β ARK) (Pitcher, 1992). La región C-terminal de β ARK (aminoácidos 558-654) presenta un dominio de homología de pleckstrina (dominio PH), que regula la formación del complejo β ARK- $\beta\gamma$, (Touhara, 1997), dicho dominio presenta una gran fuerza de unión a $G\beta\gamma$, por complementariedad de secuencia, lo que le confiere la capacidad de actuar como “secuestrador” de $G\beta\gamma$. Ya se ha reportado que la presencia de β ARK induce la progresión meiótica (Sheng, 2001).

Los sitios de unión a $G\beta\gamma$ de los canales GIRK se encuentran en los extremos N y C terminal. Se ha estudiado la unión de $G\beta\gamma$ a los canales GIRK (1-4). GIRK1 se une con mayor estabilidad a $G\beta\gamma$ debido a la formación de un sitio de unión de alta afinidad en su C terminal (aminoácidos 273-462), muy similar al dominio PH de β ARK1 (Huang et al. 1995). Sería relevante el estudio de los sitios de unión a $G\beta\gamma$ presentes en GIRK5 para determinar si presenta un sitio de mayor afinidad en el N-terminal y evaluar si es capaz de secuestrar al dímero $G\beta\gamma$.

8.3 Distribución de los canales GIRK5 y GIRK5.S en la rana hembra *X. laevis*.

Con el objetivo de determinar si el anticuerpo anti-GIRK4 permite la detección del canal GIRK5.S y, de conocer en qué tejidos de la rana *X. laevis* se expresan ambos canales, se realizó un ensayo en el que se extrajeron distintos órganos (ovocito, cerebro, corazón e hígado) de una rana hembra *X. laevis* y se analizaron mediante Western blot. Se empleó el anticuerpo anti-GIRK4 (APC-027 Alomone) como una estrategia para detectar al canal GIRK5.S, y el anticuerpo anti-GIRK5 (laboratorio de biomedicina molecular, CINVESTAV, Dr. Vianney Ortiz) para detectar al canal GIRK5.

Como se muestra en la figura 15, el anticuerpo anti-GIRK4 detectó proteínas de aproximadamente 25 kDa en ovocito, corazón e hígado, correspondientes al canal GIRK5.S (23.3 kDa); por otro lado, el anticuerpo anti-GIRK5 detectó proteínas de aproximadamente 50 kDa que corresponden al canal GIRK5 endógeno (49.5 kDa), en ovocito y en hígado.

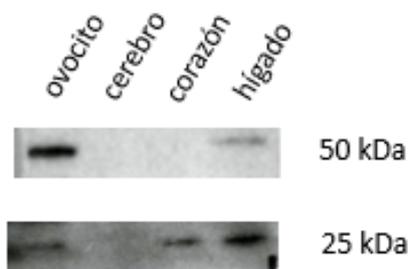


Figura 15: Western blot de las muestras de distintos órganos de una rana *X. laevis*. Se detectó la expresión de los canales GIRK5 y GIRK5.S.

En la figura 16 se presenta un esquema que resume la localización de los canales GIRK4 y GIRK5 en los órganos de *X. laevis*. Como se puede observar, ambos canales GIRK5 se expresan en hígado y en ovocito, además, GIRK5.S se expresa en corazón.

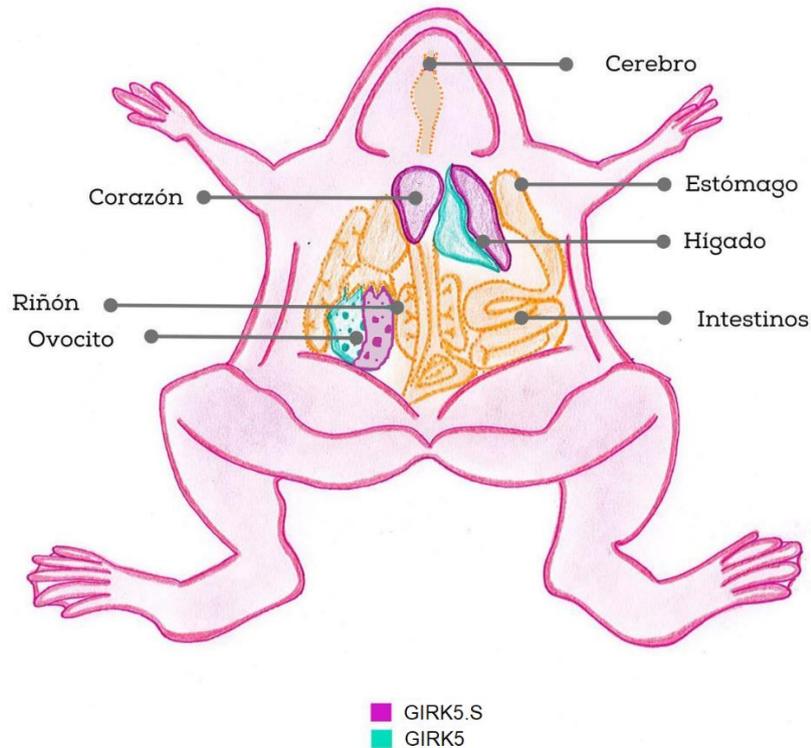


Figura 16. Localización de los canales GIRK5 y GIRK5.S endógenos en diferentes órganos de la rana *X. laevis*. En color morado se presentan los órganos en los que se expresa endógenamente el canal GIRK5.S, en color verde-agua los órganos en los que se expresa el canal GIRK5 y en anaranjado se señalan otros órganos que no fueron estudiados y el cerebro que no contiene a ninguna de las 2 proteínas.

Es la primera vez que detectamos la expresión endógena del canal GIRK5.S; dado que se expresa en el ovocito, será necesario estudiarlo de forma endógena, utilizando el anticuerpo anti-GIRK4, para determinar si se expresa en la membrana plasmática como un canal funcional; lo cual es esperable, debido a que no presenta el motivo de retención en retículo endoplásmico en su secuencia (figura 17), de hecho, GIRK5.S comienza en el mismo sitio de iniciación que la isoforma $\Delta 25$ GIRK5.

GIRK5	MIPERMAPSPQW KRLY ESPQLIQTIMARDLRVSMNQDLKVDIT 44
GIRK5.S	MARDLRVSI NQ DLEVDIT 19
$\Delta 25$ GIRK5	MARDLRVSMNQDLKVDIT 19

Figura 17. Comparación de la secuencia inicial del amino terminal de los canales GIRK5, GIRK5.S y $\Delta 25$ GIRK5. En rojo se señala el motivo de retención de retículo endoplásmico, ausente en las secuencias del canal GIRK5.S y $\Delta 25$ GIRK5.

8.4 Proteómica

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la capacidad del anticuerpo anti-GIRK5 para formar complejos inmunes con el canal GIRK5 recombinante, que posteriormente puedan ser inmunoprecipitados. Adicionalmente, se buscó inmunoprecipitar el canal GIRK4 en el ovocito y comparar ambos interactomas para determinar si comparten interacciones con las mismas proteínas a nivel intracelular.

El ensayo de proteómica se llevó a cabo procesando las muestras de inmunoprecipitación dirigidas a los canales GIRK4 y GIRK5, en lisados celulares de dos grupos de ovocitos que sobreexpresan dichas proteínas.

Se microinyectaron 160 ovocitos con 30 ng del mRNA que codifica para los canales GIRK4 y GIRK5. Pasados tres días de expresión, se lisaron los ovocitos y se determinó la concentración de proteína de los lisados; adicionalmente, se realizó un western blot para comprobar la expresión de GIRK4 y GIRK5 (Figura 18). Para el ensayo de western blot se emplearon las mismas condiciones mencionadas en la metodología del numeral 7.2.

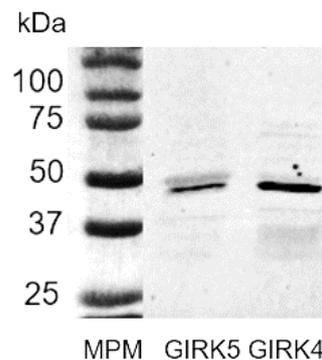


Figura 18: Control de expresión. Se muestra la detección del canal GIRK5 y GIRK4 en el lisado de ovocitos, previo al ensayo de inmunoprecipitación. El canal GIRK5 (carril 1, 49.5 kDa) se detectó empleando el anticuerpo anti-GIRK5 en una dilución 1:3,500 y el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit (AB_10015282 Jackson InmunoResearch) 1:25,000. El canal GIRK4 (carril 2, 47.43 kDa) se detectó empleando el anticuerpo anti-GIRK4 (Apc-027, Alomone) 1:200 y las mismas condiciones para el anticuerpo secundario. En el primer carril se presenta el marcador de peso molecular. La membrana de western blot se reveló en un fotodocumentador (UVP ChemStudio)

Como lo indica la figura 18, los ovocitos sí expresaron las proteínas de interés, por lo que se puede proceder con el ensayo de inmunoprecipitación; para el cuál, se utilizó el equivalente a 2 mg de proteína para cada muestra de ovocitos (inyectados con GIRK5 o GIRK4), como se indica en la metodología.

Al concluir la inmunoprecipitación, se llevó a cabo un western blot, para analizar los inmunoprecipitados obtenidos y los sobrenadantes resultantes, con el fin de determinar si las proteínas de interés fueron inmunoprecipitadas correctamente (figura 19). Las 4 muestras se cargaron en un mismo gel de poliacrilamida y, una vez transferidas las proteínas a las membranas, se cortaron los carriles 1-3 para ser incubados con el anticuerpo anti-GIRK5, y los carriles 4 y 5 con el anti-GIRK4. Como se muestra en la figura 19, no se detectó la presencia de proteína en los carriles correspondientes a los sobrenadantes (3 y 5), empleando los anticuerpos anti-GIRK5 ni anti-GIRK4, respectivamente. Por otro lado, se detectaron proteínas en los carriles de los inmunoprecipitados (2 y 4), en el peso aproximado correspondiente a los canales GIRK5 (49.5 kDa) y GIRK4 (47.4 kDa).

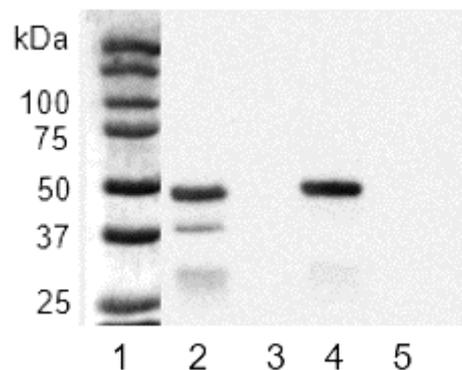


Figura 19: Control de inmunoprecipitación. Análisis de la presencia de canal GIRK4 y GIRK5 en los inmunoprecipitados y sobrenadantes obtenidos. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular; los carriles 2 (inmunoprecipitado) y 3 (sobrenadante), fueron revelados con el anticuerpo anti-GIRK5, en contraste, los carriles 4 (inmunoprecipitado) y 5 (sobrenadante), con el anti-GIRK4. El “sobrenadante de la inmunoprecipitación”, hace referencia al sobrenadante resultante tras la formación del inmunoprecipitado (Sn2, paso 3 de la metodología de inmunoprecipitación).

De estos resultados, se concluye que toda la proteína presente en los lisados celulares se inmunoprecipitó satisfactoriamente.

Una vez confirmada la inmunoprecipitación, el resto de las muestras obtenidas, se cargó en un gel de poliacrilamida que, posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (figura 20). La electroforesis se detuvo cuando las muestras corrieron aproximadamente un centímetro fuera del pozo del gel, con la intención de mantener a todas las proteínas inmunoprecipitadas, concentradas en una pequeña porción del gel, para posteriormente ser extraídas y analizadas. Este gel fue el que se procesó en el laboratorio de proteómica del CINVESTAV.

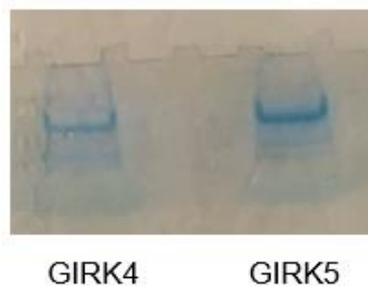


Figura 20: Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie, con las muestras correspondientes a los inmunoprecipitados dirigidos al canal GIRK4 y GIRK5, sobreexpresados en ovocitos de *X. laevis*.

8.4.1 Interactoma del inmunoprecipitado formado empleando el anticuerpo anti-GIRK4.

Las muestras de inmunoprecipitación fueron analizadas mediante cromatografía de fase reversa acoplada a espectrometría de masas, como se indica en la sección 7.4 “Obtención de interactomas”. Los resultados fueron analizados con respecto a la base de datos de *Xenopus laevis* (www.xenbase.org, mayo, 2023). Se detectaron 105 proteínas en el inmunoprecipitado dirigido al canal GIRK4; los datos fueron sometidos a una serie de filtros para seleccionar las proteínas que fueron detectadas con 95% de confiabilidad o más. Los filtros aplicados incluyen: eliminación de las proteínas que carecen de péptidos únicos que aseguren la identificación, eliminación de proteínas con confiabilidad menor al 95% y eliminación de falsos positivos o proteínas identificadas como “reverse” (de C-terminal a N-terminal).

Una vez filtrados los resultados, se obtuvieron 24 proteínas. En la tabla 3 se presentan el gen y nombre de las proteínas detectadas. Todas las proteínas

mostradas pertenecen a la especie *X. laevis*. Se ingresaron los códigos de proteína en el buscador de InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) para obtener la información que se presenta en la tabla 3, sobre las proteínas detectadas. Como se puede observar, se detectaron 3 canales iónicos de la familia GIRK: GIRK5 (Kcnj5.L), GIRK1 (Kcnj3.S) y Kcnj22.L. Adicionalmente, se puede observar que no se detectó el canal GIRK4, a pesar de haber sido sobreexpresado en los ovocitos, como se muestra en la figura 18.

Tabla 3: Código, gen, nombre y función de las proteínas que fueron identificadas por espectrometría de masas en un inmunoprecipitado dirigido al canal GIRK4 en ovocitos de *X. laevis*. La información fue obtenida del buscador de InterPro.

Código de proteína	Gen	Nombre de la proteína	Familia (InterPro)	Función molecular (InterPro)
A0A8J1LW82_XENLA	pabpc1l.S	A0A8J1LW82_XENLA	Proteína de unión a poliadenilato	Unión a RNA
RS31_XENLA	rps3-a	Proteína de subunidad ribosómica pequeña uS3A	Subunidad ribosómica pequeña	Unión a RNA
EPABB_XENLA	epabp-b	Proteína B de unión a poliadenilato	Proteína de unión a poliadenilato	Unión a RNA
Q91831_XENLA	tuba3.L	Q91831_XENLA	Tubulina	Unión a GTP
Q7ZTP0_XENLA	tuba5.S	Cadena alfa de la tubulina	Tubulina	Unión a GTP
A0A1L8EVS0_XENLA	tuba3.2.L	Cadena alfa de la tubulina	Tubulina	Unión a GTP
G3P_XENLA	gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Oxidoreductasa
Q6ING3_XENLA	prdx2.L	Peroxirredoxina 2	Peroxirredoxinas	Oxidoreductasa
Q7SYQ4_XENLA	prdx6.S	Q7SYQ4_XENLA	Peroxirredoxina	Oxidoreductasa
A0A1L8GQX2_XENLA	ldhb.S	L-lactato deshidrogenasa	L-lactato deshidrogenasa	Oxidoreductasa
Q91658_XENLA	kcnj5.L	Canal de potasio rectificador entrante, activado por proteína	Canal de potasio rectificador entrante	Canal iónico

G 5L				
A0A1L8EP07_XENLA	kcnj3.S	Canal de potasio rectificador entrante, activado por proteína G 1	Canal de potasio rectificador entrante Kir	Canal iónico
A0A1L8FPQ9_XENLA	kcnj22.L	Canal de potasio rectificador entrante, activado por proteína G	Canal de potasio rectificador entrante Kir	Canal iónico
Q6GQF3_XENLA	uba52.L	Proteína de fusión de ubiquitina eL40	Ubiquitina	Unión a proteínas
A0A1L8F3K2_XENLA	rack1.L	RACK1	Proteína de la subunidad pequeña ribosómica	Unión a proteínas
Q8AVB7_XENLA	cct2.S	Proteína del complejo T1, subunidad beta	Chaperonina Cpn60	Unión a ATP
HS90B_XENLA	hsp90ab1	Proteína de choque térmico Hsp90beta	Hsp90	Chaperona de unión dependiente de ATP
Q7ZTK6_XENLA	hspa8.L	Proteína de choque térmico de 71 kDa	Proteínas de choque térmico 70	Chaperona de unión dependiente de ATP
A0A1L8H000_XENLA	pkm.L	Piruvato cinasa	Piruvato cinasa	Actividad catalítica
Q9I8J7_XENLA	tktl2.L	Transcetolasa	-	Actividad catalítica
ACTB_XENLA	actb	Actina citoplásmica 1	Actina	Proteína estructural
A0A1L8G577_XENLA	rps7.S	Proteína ribosomal 40S, S7	Proteína ribosomal subunidad pequeña	Constituyente estructural del ribosoma
VAC14_XENLA	vac14	Proteína VAC14 homólogo	VAC14	-
A0A8J0VD96_XENLA	eif4a2.L	RNA helicasa dependiente de ATP	Helicasa	RNA helicasa

La falta de detección de la proteína a la que fue dirigida la inmunoprecipitación, puede ser un indicador de que no se realizó correctamente el análisis proteómico, ya que, previo a la inmunoprecipitación, se pudo corroborar, mediante western blot, la presencia del canal en el lisado celular. La técnica de espectrometría de masas presenta una sensibilidad bastante más elevada que la técnica de western blot, por lo que se esperaría que se detectara correctamente al canal GIRK4.

Como ya se mencionó, el canal GIRK5 se expresa endógenamente en los ovocitos de *X. laevis*. Realizando un análisis de la secuencia del canal GIRK5, con respecto al epítipo reconocido por el anticuerpo anti-GIRK4, nos dimos cuenta de que es posible que GIRK5 sea reconocido por dicho anticuerpo. La detección de GIRK5 en el inmunoprecipitado dirigido a GIRK4, puede explicarse como una reacción cruzada del anticuerpo anti-GIRK4.

En la figura 21, se presentan los aminoácidos 30-44 de la secuencia del canal GIRK5, comparada con la secuencia que es reconocida por el anticuerpo anti-GIRK4.

GIRK5	30	RVSMNQDLKVDIT	44
Epítipo vs GIRK4		RNAMNQDMEIGVT	

Figura 21: Secuencia de aminoácidos del canal GIRK5 (aa 31-43) que coincide con el epítipo que reconoce el anticuerpo anti-GIRK4. En rojo se muestran los aminoácidos que tiene en común GIRK5 con respecto al epítipo de GIRK4.

Se puede observar que el canal GIRK5 tiene 4 aminoácidos continuos (MNQD) y dos discontinuos (R y T) que pueden ser reconocidos por el anticuerpo anti-GIRK4. Debido al origen policlonal del anticuerpo anti-GIRK4, en realidad se trata de una mezcla de diversos anticuerpos que reconocen distintas secuencias lineales de un único péptido: RNAMNQDMEIGVT; es decir, reconocen múltiples epítipos de distintas longitudes a lo largo del péptido. Por lo anterior, el anticuerpo anti-GIRK4 es propenso a la reactividad cruzada con proteínas que compartan secuencias similares a las del inmunógeno inicial, como el canal GIRK5; debido a esto, es posible que la banda correspondiente a la proteína detectada por el anticuerpo anti-GIRK4 en el carril 3 de la figura 18, represente una mezcla de los canales GIRK4

(recombinante) y GIRK5 (endógeno). A pesar de la reacción cruzada con GIRK5, el canal GIRK4 también debió ser detectado en el ensayo proteómico, debido a que se encontraba sobreexpresado, sin embargo, no ocurrió así, por lo que los resultados obtenidos no son tan confiables. Una forma de evitar la generación de reacciones cruzadas con el anticuerpo sería emplear anticuerpos monoclonales; existen anticuerpos monoclonales comerciales para GIRK4 pero no para GIRK5.

En conclusión, los resultados obtenidos del ensayo proteómico no son confiables porque no se logró detectar a la proteína de interés, Girk4, lo que hace dudar sobre las demás proteínas detectadas; a pesar de que se logró realizar la inmunoprecipitación correctamente, el análisis proteómico no resultó como se esperaba.

8.4.2 Interactoma del inmunoprecipitado formado empleando el anticuerpo anti-GIRK5

Para la generación del interactoma, se realizó una inmunoprecipitación utilizando al anticuerpo anti-GIRK5, en un lisado celular de ovocitos que sobreexpresan al canal, con el objetivo de inmunoprecipitar al canal GIRK5 endógeno y recombinante.

Se detectaron 7 proteínas, con el 95% de confianza, en el inmunoprecipitado del canal GIRK5. Como se puede observar en la tabla 4, no se detectó al canal GIRK5.

La ausencia de detección de la proteína de interés sugiere que, aunque se haya obtenido correctamente el inmunoprecipitado (Figura 10), hubo algunas deficiencias en el análisis proteómico. Además, en la Tabla 4 se observa la presencia de proteínas queratinas, un contaminante común en las preparaciones de muestras para proteómica, que puede provenir de polvo, cabello, pelusas, entre otros. Existe incertidumbre sobre si esta contaminación ocurrió durante la inmunoprecipitación o durante el análisis proteómico posterior.

Tabla 4: Código, gen, nombre y función de las proteínas que fueron identificadas por espectrometría de masas en un inmunoprecipitado dirigido al canal GIRK5 en ovocitos de *X. laevis*. La información fue obtenida del buscador de InterPro.

Código de proteína	Gen	Nombre de la proteína	Familia (InterPro)	Función molecular (InterPro)
K2C8_XENLA	-	Queratina de citoesqueleto tipo II	Queratina tipo II	-
A0A1L8EVH5_XENLA	krt8.2.L	Proteína de filamento intermedio ON3	Queratina tipo II	-
A0A8J0TKB9_XENLA	lin52.L	Homólogo de la proteína Lin-52	Proteína Lin-52	-
ACTB_XENLA	actb	Actina citoplásmica 1	Actinas	-
A0A1L8FDL8_XENLA	LOC108697909	Tripsina	Peptidasa 1A	Actividad catalítica
Q91831_XENLA	tubal3.L	Cadena alfa de la tubulina	Tubulina	Proteína estructural
A0A1L8F7L7_XENLA	upf3b.L	Proteína que contiene el dominio UPF3	UPF3	Unión a ácidos nucleicos

Dado que ambos inmunoprecipitados (dirigidos a GIRK5 y GIRK4) se realizaron el mismo día y en las mismas condiciones, pero solo se observó contaminación en la muestra de GIRK5, es probable que la contaminación haya ocurrido durante el análisis posterior a la obtención del inmunoprecipitado. Una forma de verificar esto sería realizar un western blot de la muestra utilizando un anticuerpo anti-queratina, lo que ayudaría a determinar si la contaminación se originó en nuestro laboratorio. Sin embargo, toda la muestra obtenida fue enviada al laboratorio de proteómica, por lo que ya no es posible realizar este control.

En caso de que la contaminación fuera derivada de la preparación de la muestra, es posible mejorar la técnica de inmunoprecipitación; emplear un anticuerpo monoclonal, aumentar la concentración del anticuerpo o realizar más de un ciclo de inmunoprecipitación en el mismo lisado celular podría ayudar obtener un inmunoprecipitado enriquecido y disminuir las reacciones cruzadas con otras proteínas. Adicionalmente, se debe mencionar la importancia de realizar los

controles pertinentes para este tipo de ensayo. Previo a la inmunoprecipitación, se realizaron controles para confirmar la presencia de las proteínas de interés en el lisado celular, mediante western blot (17) y controles para verificar la ausencia de proteínas en los sobrenadantes de la inmunoprecipitación (figura 19); además, se realizó un pre-aclarado de los lisados previo a la inmunoprecipitación para eliminar las proteínas que se unen de manera no específica a las perlas magnéticas. Sin embargo, se omitió el control negativo utilizando suero normal de conejo en lugar del anticuerpo específico. La inclusión de este control es crucial para establecer el nivel basal de interacciones no específicas entre las IgG y las proteínas de la muestra. La ausencia de este control representa una limitación en la interpretación de los resultados obtenidos. Para futuros ensayos de inmunoprecipitación, se sugiere considerar estos consejos, así existe una mayor probabilidad de obtener mejores resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, considerando el antecedente del interactoma de la construcción EGFP-GIRK5, y tomando como una limitación la falta de evidencia sobre la función del canal GIRK5, quizá la proteómica no resulte tan útil, en este caso, para determinar las proteínas con las que interactúa el canal GIRK5.

8.5 Efecto del inhibidor de cinasas de tirosina PP1 en la localización del canal GIRK5.

PP1 es una pirazolopirimidina sintética, empleada como inhibidor selectivo de las cinasas de tirosina de la familia Src (Tokmakov et al. 2005). Está reportado que la expresión constitutiva de las cinasas de tirosina Src acelera la maduración del ovocito de *X. laevis* (Kinsey, et al., 2014). Se sabe que para que el canal se pueda expresar en la membrana plasmática, se necesita la acción de una fosfatasa endógena que desfosforile la tirosina Y16, de manera que se “rompa” el motivo de retención de retículo endoplásmico. Debido a la importancia de la participación de las cinasas Src en el proceso de maduración del ovocito, y la modulación de la localización del canal GIRK5 mediada por fosforilación, es relevante determinar si una cinasa de la familia Src es la responsable. Considerando el papel crucial que

desempeñan las cinasas Src en el proceso de maduración del ovocito y su capacidad para modular la localización del canal GIRK5 mediante la fosforilación, es de gran relevancia establecer si alguna cinasa perteneciente a la familia Src es la responsable de este fenómeno.

Se insertó la secuencia del canal GIRK5 en el programa Netphos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>), que predice sitios de fosforilación; se buscaron específicamente las cinasas que podrían tener un sitio de fosforilación en la tirosina 16 (Y16; figura 22); la Y16 puede ser fosforilada por una cinasa Src.

#	x	Context	Kinase
16	Y	WKRLYESPQ	unsp
16	Y	WKRLYESPQ	INSR
16	Y	WKRLYESPQ	SRC
16	Y	WKRLYESPQ	EGFR

Figura 22 Cinasas de tirosina con sitios de fosforilación en la tirosina Y16 del canal GIRK5.

8.5.1 Registros electrofisiológicos

Para poder determinar si la cinasa Src es la responsable de fosforilar al canal GIRK5, se realizó un ensayo electrofisiológico, utilizando el inhibidor de cinasas de tirosina PP1. Si una cinasa Src es la responsable de fosforilar a GIRK5, en un ensayo electrofisiológico, se esperaría que los ovocitos incubados con PP1 presenten una corriente de K⁺ mayor, comparados con los ovocitos control; sin embargo, el ensayo no fue concluyente (no se incluyen los registros electrofisiológicos), debido a que se registraron diversas corrientes que no pertenecían al canal GIRK5. Por esta razón, se decidió usar la técnica de microscopía confocal con el mismo objetivo de determinar el efecto de PP1 en la localización del canal GIRK5.

8.5.2 Microscopía confocal

Se realizaron cortes a un grupo de ovocitos que sobreexpresan la quimera EGFP-GIRK5 y que fueron, o no, sometidos a tratamiento con el inhibidor PP1, (1h de incubación) para poder observarlos en un microscopio confocal (Consultar “Corte histológico” y “Microscopía confocal” en el Apéndice).

En la figura 23 se presentan los resultados preliminares del protocolo de inhibición de la cinasa Src por PP1, en ovocitos inyectados con la quimera EGFP-GIRK5. Los resultados presentados corresponden a los ovocitos de los grupos 1 (control) y 4 (PP1), 48 horas después de la inyección de mRNA.

Se muestran las imágenes de campo claro y dos planos Z de microscopía confocal (representativos de la visualización de 6 campos para cada ovocito).

Se observa fluorescencia en toda la superficie del corte del ovocito control (figura 23A), en contraste con el patrón de fluorescencia de los cortes del ovocito que fue incubado con PP1 (figura 23B), en el que se observa un patrón de fluorescencia en dirección a la periferia celular.

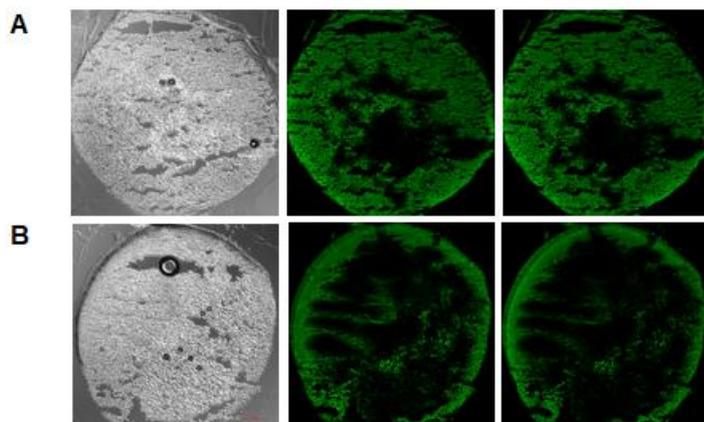


Figura 23: Localización de la quimera EGFP-GIRK5 tras la inhibición de cinasas Src por PP1. (A) Ovocitos control incubados con DMSO. (B) Ovocitos incubados con PP1 10 μ M. Objetivo 10x

La incubación de ovocitos que expresan EGFP-GIRK5 durante una hora, con los inhibidores de PTK, genisteína (20 μ M) y geldanamicina (75 nM), produjo un aumento en la corriente del canal GIRK5, así como su traslocación hacia la membrana (figura 24B); en comparación con ovocitos que no fueron incubados con los inhibidores (figura 24A) (Mora y Escobar 2005).

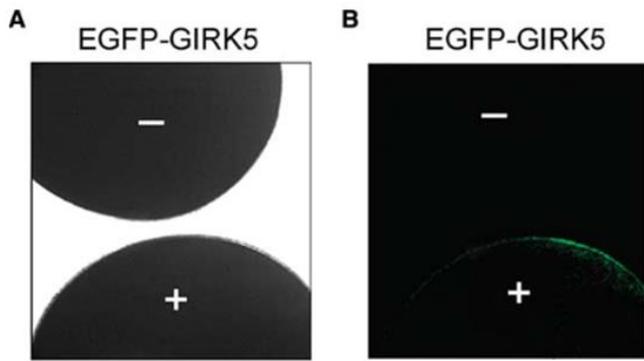


Figura 24. El inhibidor geldanamicina promueve la expresión del canal GIRK5 en la membrana plasmática. Ovocitos que sobreexpresan la quimera EGFP-GIRK5, incubados con (+) o sin (-) inhibidor, analizados por microscopía óptica (A) y confocal (B). Modificada de (Mora & Escobar, 2005)

En nuestro ensayo se utilizó al inhibidor PP1, debido a que las pirazolopirimidinas PP1 y PP2 inhiben preferencialmente a la familia SFK: c-Src, Lck, Fgr, Yes, Fyn, Hck, Lyn); en contraste con genisteína y geldanamicina, que son considerados inhibidores generales de PTK (Joly et al., 1997; Vela et al., 2010); sin embargo, PP1 y PP2 también tienen efecto sobre cinasas de serina y treonina (Bain et al., 2007; Bartscht et al., 2017; Hanke, s. f.).

Se ha recomendado el uso conjunto de PP1+PP2, o alguno de los anteriores junto con el inhibidor Src-I1, para evaluar las funciones fisiológicas de las SFK, aunque ninguno logra discriminar entre los 7 miembros de la familia (Bain et al., 2007).

Los resultados del primer protocolo de inhibición que se realizó son prometedores. Es pertinente diseñar y probar nuevos protocolos de inhibición, modificando algunas condiciones experimentales, como la concentración de inhibidor, el tiempo de expresión del canal o el tiempo de incubación con el inhibidor; como se mencionó anteriormente, a las 48 horas post-inyección fue cuando se detectó fluorescencia en la MP, como indicador de la translocación de EGFP-GIRK5, debido a la inhibición de cinasas de tirosina por PP1.

Díaz-Bello et al. (2013) reportaron el curso temporal de la expresión del constructo EGFP-GIRK5Y16A y no fue, sino hasta las 96 horas post-inyección, que se observó fluorescencia en la membrana plasmática del polo vegetal; para futuros ensayos, el protocolo deberá incluir el tiempo de 96 horas post-inyección. Adicional a esto, es necesario continuar practicando los cortes histológicos para poder mantener la integridad de la célula, antes de repetir el ensayo.

La distribución de los canales GIRK depende de la expresión de motivos de exportación y retención del retículo endoplásmico, en la región amino terminal: DQDVESPV para GIRK2 y NQDMEIGV para GIRK4. GIRK1 ni GIRK3 tienen un motivo de exportación, por lo tanto, requieren de la formación de heterotetrámeros con otras subunidades, como GIRK4 para expresarse en la membrana plasmática (Ma et al. 2002); la mutación o enmascaramiento de dichos motivos, cuando un monómero se asocia, es lo que permite que el canal cambie de localización. En el caso del canal GIRK5, es necesaria la mutación o desfosforilación del motivo de retención para poder salir del retículo endoplásmico; se desconoce si GIRK5 tiene un motivo de exportación de retículo endoplásmico.

A pesar de nuestro interés por mantener al canal GIRK5 desfosforilado, con la intención de estudiarlo en la membrana plasmática, hay que considerar que también podría cumplir una función en el retículo endoplásmico. Existen una gran diversidad de canales iónicos que se expresan en la membrana del retículo endoplásmico, entre ellos: los canales K_{ATP} y canales de potasio activados por Ca^{2+} (K_{Ca}).

Los canales iónicos se ensamblan en el retículo endoplásmico, pasan por el aparato de Golgi y después se transportan hacia su destino final, por lo que es difícil saber si cumplen una función en el retículo endoplásmico; sin embargo, se ha observado que algunos canales de potasio, son más abundantes en retículo endoplásmico, comparado con otras estructuras celulares (Kuum, Veksler, y Kaasik 2015): los canales K_{ATP} (canales de potasio sensibles a ATP) presentan un motivo de retención a retículo endoplásmico que los mantiene retenidos, hasta ensamblar sus subunidades Kir6.X y SUR; cuando esto ocurre, la nueva configuración ensamblada “enmascara” las señales de retención, permitiendo que el canal se transloque a la membrana plasmática (Zerangue et al. 1999). Adicionalmente, existen canales K_{ATP} funcionales que se mantienen retenidos en retículo endoplásmico; la subunidad Kir6.1 se localiza principalmente en el retículo endoplásmico, en contraste con Kir6.2 que se localiza en membrana plasmática (Ng et al. 2010); a pesar de que se ha demostrado que algunas subunidades de canales K_{ATP} se localizan en retículo endoplásmico, son limitadas las evidencias sobre la función que desempeñan.

Por otro lado, los canales SK_{Ca} (canales de potasio de baja conductancia sensibles a Ca^{2+}) se localizan en membrana plasmática y también en retículo endoplásmico,

debido a que poseen motivos de retención a retículo endoplásmico en el extremo N-terminal; en (Kuum, Veksler, y Kaasik 2015) se sugiere que los canales SK_{Ca} regulan el flujo de Ca²⁺ en el retículo endoplásmico.

Se propone que la función de los canales de potasio en retículo endoplásmico, es modular el flujo de Ca²⁺ o equilibrar el movimiento de cargas que produce el flujo de Ca²⁺, desde o hacia el retículo endoplásmico (Kuum, Veksler, y Kaasik 2015).

La pregunta es: ¿podría el canal GIRK5 cumplir una función en el retículo endoplásmico, que sea independiente de la modulación del flujo de Ca²⁺, o solo se mantiene retenido hasta poder ser translocado hacia la membrana plasmática, debido al enmascaramiento del motivo de retención?

9. Conclusiones

- La sobreexpresión del canal GIRK4 no tiene efecto sobre la maduración del ovocito de *X. laevis*.
- El anticuerpo anti-GIRK4 permite detectar la presencia de los canales GIRK5 y GIRK5.S.
- El canal GIRK5, además de en ovocito, se expresa endógenamente en hígado de la rana hembra *X. laevis*.
- El canal GIRK5.S se expresa endógenamente en ovocito, hígado y corazón de la rana hembra *X. laevis*.
- Los anticuerpos anti-GIRK5 y anti-GIRK4 son aptos para ensayos de inmunoprecipitación.
- No se logró la obtención de los interactomas de los canales GIRK5 y GIRK4 debido a la falta de veracidad de los resultados obtenidos del ensayo proteómico.
- El protocolo de proteómica, utilizado para la identificación de interacciones proteína-proteína, no es tan útil en el estudio de proteínas que han sido poco estudiadas, como el caso de GIRK5, debido a que no existen registros publicados sobre sus interacciones.
- El tratamiento con el inhibidor PP1 estimula la translocación del canal GIRK5 a la membrana plasmática.

10. Preguntas actuales.

Derivado de los resultados obtenidos en el presente trabajo, surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿La participación del canal GIRK5 en la maduración del ovocito es independiente de su localización en la membrana plasmática?

¿GIRK5 es un secuestrador de dímero $G\beta\gamma$? ¿en dónde se encuentran sus sitios de unión a $G\beta\gamma$?

¿GIRK5 cumple una función en el retículo endoplásmico?

¿Girk5.S se expresa en la membrana plasmática? ¿cuál es su función?

11. Perspectivas

- Determinar la expresión del canal GIRK5.S en la membrana plasmática del ovocito de *X. laevis*.
- Estudiar la función que desempeña el canal GIRK5.S en los ovocito, corazón e hígado de *X. laevis*.
- Observar el efecto de la sobreexpresión de la isoforma $\Delta 25$ GIRK5 en la maduración in vitro de los ovocitos.
- Estudiar la afinidad de los sitios de unión de GIRK5 a la subunidad $G\beta\gamma$.
- Desarrollar nuevos protocolos de inhibición con PP1

11. Literatura citada

- Abyntek. (2016, julio 28). Cómo diseñar un buen antígeno peptídico. *Abyntek Biopharma*
- Abyntek. (2020, enero 16). Métodos de detección para Western Blot. *Abyntek Biopharma*. <https://www.abynetek.com/metodos-de-deteccion-para-western-blot/>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
- Álvarez-Romero, J., R. A. Medellín, H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita. 2005. *Xenopus laevis*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Xenopuslaevis00.pdf>
- Antrobus, R., & Borner, G. H. H. (2011). Improved Elution Conditions for Native Co-Immunoprecipitation. *PLoS ONE*, 6
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R., & Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *The Biochemical Journal*
- Barker, B. S., Young, G. T., Soubrane, C. H., Stephens, G. J., Stevens, E. B., & Patel, M. K. (2017). Ion Channels. En *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 11-43). Elsevier.
- Bartscht, T., Rosien, B., Rades, D., Kaufmann, R., Biersack, H., Lehnerta, H., & Ungefroren, H. (2017). Inhibition of TGF- β Signaling in Tumor Cells by Small

Molecule Src Family Kinase Inhibitors.

Bates RC, Fees CP, Holland WL, Winger CC, Batbayar K, Ancar R, Bergren T, Petcoff D, Stith BJ. Activation of Src and release of intracellular calcium by phosphatidic acid during *Xenopus laevis* fertilization. *Dev Biol*. 2014 Feb 1;386(1):165-80

Bayaa M, Booth RA, Sheng Y, Liu XJ. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12607-12.

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

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

Bilbrough T, Piemontese E, Seitz O. Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chem Soc Rev*. 2022 Jul 4;51(13):5691-5730.

Black, L. E., Longo, J. F., & Carroll, S. L. (2019). Mechanisms of Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-3 (ERBB3) Action in Human Neoplasia. *The American Journal of Pathology*, 189(10), 1898-1912.

Chávez García, K. A., (2021), *Interactoma del canal de potasio GIRK5 de los ovocitos de la rana xenopus laevis* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM-UNAM.

Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 115-121.

Crawford, R. M., Budas, G. R., Jovanović, S., Ranki, H. J., Wilson, T. J., Davies, A. M., & Jovanović, A. (2002). M-LDH serves as a sarcolemmal K(ATP) channel

- subunit essential for cell protection against ischemia. *The EMBO Journal*, 21(15), 3936-3948.
- Dale, B., & de Santis, A. (1981). Maturation and fertilization of the sea urchin oocyte: An electrophysiological study. *Developmental Biology*,
- Day, M. L., Pickering, S. J., Johnson, M. H., & Cook, D. I. (1993). Cell-cycle control of a large-conductance K⁺ channel in mouse early embryos. *Nature*, 365(6446), 560-562.
- DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., & Cahalan, M. D. (1984). Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: A role in mitogenesis? *Nature*, 307(5950), 465-468.
- Deshpande, G. P., Patterton, H.-G., & Essop, M. F. (2019). The human transketolase-like proteins TKTL1 and TKTL2 are bona fide transketolases. *BMC Structural Biology*, 19.
- Díaz-Bello, B., Rangel-García, C. I., Salvador, C., Carrisoza-Gaytán, R., & Escobar, L. I. (2013). The polarization of the G-protein activated potassium channel GIRK5 to the vegetal pole of *Xenopus laevis* oocytes is driven by a di-leucine motif. *PloS One*, 8(5), e64096.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S., & Ruderman, J. V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16794-16799.

- Dworkin, M. B., & Dworkin-Rastl, E. (1989). Metabolic regulation during early frog development: Glycogenic flux in *Xenopus* oocytes, eggs, and embryos. *Developmental Biology*,
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., & Sun, Q. Y. (2002). [Protein kinases involved in the meiotic maturation and fertilization of oocyte]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 34(3), 259-265.
- Farhana, A., & Lappin, S. L. (2023). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., & Brown, A. M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5187), 1068-1072.
- Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug;93(8):3117-23.
- Graf, Jean-Daniel, y Hans Rudolf Kobel. 1991. «Chapter 2 Genetics of *Xenopus Laevis*». En *Methods in Cell Biology*, 36:19-34. Elsevier.
- Gohara, D. W., & Di Cera, E. (2016). Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20840-20848.
- Gou Donglin, R. Yajamana, Angela M. Klen, Zhe Lu. (2003). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annual Review of Physiology*, 66, 103-129.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., & Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.

Nature, 233(5316), 177-182.

Han, Jaehee, Dawon Kang, y Donghee Kim. 2003. «Properties and Modulation of the G Protein-Coupled K⁺ Channel in Rat Cerebellar Granule Neurons: ATP versus Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate». *The Journal of Physiology* 550 (Pt 3): 693-706

Hanke, 1996. (s. f.). *Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor | Elsevier Enhanced Reader*.

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

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

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Third Edition, Third Edition). Oxford University Press.

Huang, C. L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1995). Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron*, 15(5), 1133-1143.

Huang, C.-L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1997). *Binding of the G protein $\beta\gamma$ subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels*. 8.

Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 373-398.

Ismailov, I. I., & Benos, D. J. (1995). Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney International*, 48(4), 1167-1179.

<https://doi.org/10.1038/ki.1995.400>

- Israelsen, W. J., & Vander Heiden, M. G. (2015). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, *43*, 43-51.
- Joly, G. A., Ayres, M., & Kilbourn, R. G. (1997). Potent inhibition of inducible nitric oxide synthase by geldanamycin, a tyrosine kinase inhibitor, in endothelial, smooth muscle cells, and in rat aorta. *FEBS Letters*, *403*(1), 40-44.
- Josefsberg Ben-Yehoshua, L., Lewellyn, A. L., Thomas, P., & Maller, J. L. (2007). The Role of Xenopus Membrane Progesterone Receptor β in Mediating the Effect of Progesterone on Oocyte Maturation. *Molecular Endocrinology*, *21*(3), 664-673.
- Jovanović, S., Du, Q., Crawford, R. M., Budas, G. R., Stajljarić, I., & Jovanović, A. (2005). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase serves as an accessory protein of the cardiac sarcolemmal KATP channel. *EMBO Reports*, *6*(9), 848-852.
- Kim, Y., Kim, E.-Y., Seo, Y.-M., Yoon, T. K., Lee, W.-S., & Lee, K.-A. (2012). Function of the pentose phosphate pathway and its key enzyme, transketolase, in the regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, *39*(2), 58-67.
- King, M. L., Messitt, T. J., & Mowry, K. L. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biology of the Cell*, *97*(1), 19-33.
- Kinsey WH. SRC-family tyrosine kinases in oogenesis, oocyte maturation and fertilization: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol*. 2014;759: 33-56.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., & Etkin, L. D. (2001). Mitochondrial ribosomal RNA

- in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 67(3), 80-83.
- Kofuji, P., Davidson, N., & Lester, H. A. (1995). Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6542-6546.
- Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirović, B., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins. *Nature*, 374(6518), 135-141.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Nung Jan, Y., & Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362(6416), Article 6416.
- Kuum, Malle, Vladimir Veksler, y Allen Kaasik. 2015. «Potassium fluxes across the endoplasmic reticulum and their role in endoplasmic reticulum calcium homeostasis». *Cell Calcium, SI: Organellar Channels & Transporters*, 58 (1): 79-85.
- León-Aparicio, D., Salvador, C., Aparicio-Trejo, O. E., Briones-Herrera, A., Pedraza-Chaverri, J., Vaca, L., Sampieri, A., Padilla-Flores, T., López-González, Z., León-Contreras, J. C., Hernández-Pando, R., & Escobar, L. I. (2019). Novel Potassium Channels in Kidney Mitochondria: The Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Gated HCN Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 4995.
- Lesage, F., Duprat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T., Lazdunski, M., & Hugnot, J. P. (1994). Cloning provides evidence for a family of inward rectifier

- and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Letters*, 353(1), 37-42.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Fosset, M., Romey, G., Barhanin, J., & Lazdunski, M. (1995). Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(48).
- Lewis DL, Ikeda SR, Aryee D, Joho RH. Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from rat basophilic leukemia cell mRNA in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 1991 Sep 23;290(1-2):17-21.
- Li, Chao, Jin Wei, Ying Li, Xiao He, Qian Zhou, Jie Yan, Jing Zhang, Ying Liu, Yu Liu, y Hong-Bing Shu. 2013. «Transmembrane Protein 214 (TMEM214) Mediates Endoplasmic Reticulum Stress-induced Caspase 4 Enzyme Activation and Apoptosis». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17908-17.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372(6504), 366-369.
- Low, Felicia M., Mark B. Hampton, y Christine C. Winterbourn. 2008. «Peroxiredoxin 2 and Peroxide Metabolism in the Erythrocyte». *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (9): 1621-30
- Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T. C., & Guggino, W. B. (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal*, 57.
- Lutz, L. B., Kim, B., Jahani, D., & Hammes, S. R. (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52).

- Ma, Dzwokai, Noa Zerangue, Kimberly Raab-Graham, Sharon R. Fried, Yuh Nung Jan, y Lily Yeh Jan. 2002. «Diverse Trafficking Patterns Due to Multiple Traffic Motifs in G Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channels from Brain and Heart». *Neuron* 33 (5): 715-29
- Maccarrone G, Bonfiglio JJ, Silberstein S, Turck CW, Martins-de-Souza D. Characterization of a Protein Interactome by Co-Immunoprecipitation and Shotgun Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2017;1546:223-234.
- MacFarlane, S. N., & Sontheimer, H. (2000). Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia*, 30(1), 39-48.
- Maller, J. L., & Krebs, E. G. (1980). Regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 16, 271-311.
- Mao, J., Wang, X., Chen, F., Wang, R., Rojas, A., Shi, Y., Piao, H., & Jiang, C. (2004). Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K(+) channels by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4).
- Mark, M. D., & Herlitze, S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*, 267(19).
- Marteil, G., Richard-Parpaillon, L., & Kubiak, J. Z. (2009). Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*, 9(3), 203-224.
- Matten, W., Daar, I., & Vande Woude, G. F. (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular and Cellular Biology*, 14(7).
- Mele, A., Buttiglione, M., Cannone, G., Vitiello, F., Camerino, D. C., & Tricarico, D.

- (2012). Opening/blocking actions of pyruvate kinase antibodies on neuronal and muscular KATP channels. *Pharmacological Research*, 66(5), 401-408.
- Merriam, R. W., Sauterer, R. A., & Christensen, K. (1983). A subcortical, pigment-containing structure in *Xenopus* eggs with contractile properties. *Developmental Biology*, 95(2), 439-446.
- Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 215(1201), 491-497.
- Moody, W. J. (1985). The development of calcium and potassium currents during oogenesis in the starfish, *Leptasterias hexactis*. *Developmental Biology*, 112.
- Mora, S. I., & Escobar, L. I. (2005). Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Letters*, 579(14).
- Müllner, C., Vorobiov, D., Bera, A. K., Uezono, Y., Yakubovich, D., Frohnwieser-Steinecker, B., Dascal, N., & Schreibmayer, W. (2000). Heterologous facilitation of G protein-activated K(+) channels by beta-adrenergic stimulation via cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of General Physiology*, 115(5), 547-558.
- Mundiña-Weilenmann, C., Chang, C. F., Gutierrez, L. M., & Hosey, M. M. (1991). Demonstration of the phosphorylation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in chick skeletal muscle and the resultant activation of the channels after reconstitution. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4067-4073.
- Nader, N., Courjaret, R., Dib, M., Kulkarni, R. P., & Machaca, K. (2016). *Xenopus* oocyte prophase I meiotic arrest is released independently from a decrease in cAMP levels or PKA activity (2016). *Development*, dev.136168.

- Nebreda, A. R., & Ferby, I. (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 666-675.
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J.-P. (2012). GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(8), 674-679.
- Ng, Keat-Eng, Sarah Schwarzer, Michael R. Duchon, y Andrew Tinker. 2010. «The Intracellular Localization and Function of the ATP-Sensitive K⁺ Channel Subunit Kir6.1». *The Journal of Membrane Biology* 234 (2): 137-47.
- Numann, R., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (1991). Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5028), 115-118.
- Oria-Hernández, J., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., & Ramírez-Silva, L. (2005). Pyruvate kinase revisited: The activating effect of K⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37924-37929.
- Ohsumi K, Sawada W, Kishimoto T. Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci*. 1994 Nov;107.
- Pitcher, J., Inglese, J., Higgins, J., Arriza, J., Casey, P., Kim, C., ... Lefkowitz, R. (1992). Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, 257(5074), 1264–1267.
- Pfaffinger, P. J., Martin, J. M., Hunter, D. D., Nathanson, N. M., & Hille, B. (1985). GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature*, 317(6037), 536-538.
- Qian, Yi, Xiaofei Zou, Xiuru Liang, Nan Lu, Yugui Cui, Jiayin Liu, y Yan Meng. 2022. «Peroxisome oxidoreductin 4, a New Favorable Regulator, Can Protect Oocytes against

- Oxidative Stress Damage during in Vitro Maturation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 601 (abril): 52-58.
- Rangel-Garcia, C. I., Salvador, C., Chavez-Garcia, K., Diaz-Bello, B., Lopez-Gonzalez, Z., Vazquez-Cruz, L., Vazquez-Martinez, J. A., Ortiz-Navarrete, V., Riveros-Rosas, H., & Escobar, L. I. (2021). Identification of a unique endoplasmic retention motif in the *Xenopus* GIRK5 channel and its contribution to oocyte maturation. *FEBS Open Bio*, 11(4), 1093-1108.
- Ritchie, A. K. (1993). Estrogen increases low voltage-activated calcium current density in GH3 anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 132(4), 1621-1629.
- Ruppertsberg, J. P. (2000). Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 441(1), 1-11.
- Saleh, S., Staes, A., Deborggraeve, S., & Gevaert, K. (2019). Targeted Proteomics for Studying Pathogenic Bacteria. *Proteomics*, 19(16), e1800435.
- Salvador, C., Martinez, M., Mora, S. I., Egado, W., Farias, J. M., Gamba, G., & Escobar, L. I. (2001). Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1512(1), 135-147.
- Salvador, C., Mora, S. I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L., & Escobar, L. I. (2003). Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences*, 72(13), 1509-1518.
- Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A. K., & Batra, S. K. (2012). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 15-31.
- Session, Adam M., Yoshinobu Uno, Taejoon Kwon, Jarrod A. Chapman, Atsushi Toyoda, Shuji Takahashi, Akimasa Fukui, et al. 2016. «Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*». *Nature* 538 (7625): 336-43.
- Shafer, M. E. R., Willson, J. A., & Damjanovski, S. (2011). Expression analysis of the

- peroxiredoxin gene family during early development in *Xenopus laevis*. *Gene Expression Patterns*, 11(8), 511-516.
- Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., & Ravin, V. K. (2016). [*Xenopus laevis* peroxiredoxins: Gene expression during development and characterization of the enzymes]. *Molekuliarnaia Biologiya*, 50(2), 336-346.
- Sharapov, M. G., & Ravin, V. K. (2009). Peroxiredoxin 6 from the clawed frog *Xenopus laevis*: CDNA cloning, enzyme characterization, and gene expression during development. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74(8), 898-902.
- Sheng, Y., Tiberi, M., Booth, R. A., Ma, C., & Liu, X. J. (2001). Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Current Biology: CB*, 11(6), 405-416.
- Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J*. 2017 Feb;36(1):1-6.
- Smith, P. A., Sellers, L. A., & Humphrey, P. P. (2001). Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K⁺ channels in MIN-6 cells. *The Journal of Physiology*, 532(Pt 1), 127-142.
- Takano, K., Stanfield, P. R., Nakajima, S., & Nakajima, Y. (1995). Protein kinase C-mediated inhibition of an inward rectifier potassium channel by substance P in nucleus basalis neurons. *Neuron*, 14(5), 999-1008.
- Touhara K. Binding of multiple ligands to pleckstrin homology domain regulates membrane translocation and enzyme activity of beta-adrenergic receptor kinase. *FEBS Lett*. 1997 Nov 10;417(2):243-8.
- Tokmakov, Alexander, Tetsushi Iwasaki, Shuji Itakura, Ken-Ichi Sato, Mikako Shirouzu, Yasuo Fukami, y Shigeyuki Yokoyama. 2005. «Regulation of Src Kinase Activity during *Xenopus* Oocyte Maturation». *Developmental Biology*

278 (2): 289-300.

Tosti, E. (2006). Calcium ion currents mediating oocyte maturation events.

Reproductive Biology and Endocrinology,

Tosti, E., Boni, R., Gallo, A., & Silvestre, F. (2013). Ion currents modulating oocyte maturation in animals. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(2), 61-68.

Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2014).

Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 20130094.

Vela, E. M., Knostman, K. A., Mott, J. M., Warren, R. L., Garver, J. N., Vela, L. J., & Stammen, R. L. (2010). Genistein, a general kinase inhibitor, as a potential antiviral for arenaviral hemorrhagic fever as described in the Pirital virus-Syrian golden hamster model. *Antiviral Research*, 87(3), 318-328.

Wang, J., & Liu, X. J. (2004). Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: Demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 21), 5107-5116.

Weber, W. M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: Recent developments. *The Journal of Membrane Biology*, 170(1), 1-12.

Weiss, J. N., & Lamp, S. T. (1989). Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *The Journal of General Physiology*, 94(5), 911-935.

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

- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159-1204.
- Wood, Zachary A, Ewald Schröder, J Robin Harris, y Leslie B Poole. 2003. «Structure, Mechanism and Regulation of Peroxiredoxins». *Trends in Biochemical Sciences* 28 (1): 32-40.
- Yamada, M., Inanobe, A., & Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacological Reviews*, 50(4), 723-760.
- Yu, L.-R., Stewart, N. A., & Veenstra, T. D. (2010). Chapter 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. En G. S. Ginsburg & H. F. Willard (Eds.), *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* (pp. 89-96). Academic Press.
- Zerangue, Noa, Blanche Schwappach, Yuh Nung Jan, y Lily Yeh Jan. 1999. «A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane KATP Channels». *Neuron* 22 (3): 537-48
- Zhang, Q., Pacheco, M. A., & Doupnik, C. A. (2002). Gating properties of girk channels activated by gao- and Gai-Coupled Muscarinic m2 Receptors in Xenopus Oocytes: The Role of Receptor Precoupling in RGS Modulation. *The Journal of Physiology*, 545(Pt 2), 355-373.
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D. L., & Paša-Tolić, L. (2014). High-Throughput Proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1), 427-454.

Apéndice

Preparación del buffer de lisis

Tomar los volúmenes de cada reactivo, a partir de soluciones stock 1 M y 0.1 M para el DTT.

Para preparar 50 mL de Buffer:

Reactivo	Concentración final	Masa	Volumen
B-glicerofosfato	80 mM	0.864 g	-
NaF	50 mM	0.105 g	-
EGTA	20 mM	-	1 mL
Hepes	20 mM	-	1 mL
MgCl₂	15 mM	-	0.75 mL
DTT	1 mM	-	0.5 mL

* Ajustar pH final 7.5

Preparación de solución ND96 sin calcio.

Para preparar 2 L colocar las siguientes cantidades en un vaso de precipitados de 1L:

Todos los reactivos se encuentran en una concentración de 1 M.

192 mL NaCl
4 mL KCl
10 mL HEPES
2 mL MgCl₂
5 mL piruvato de sodio

Agregar el volumen suficiente de agua desionizada para poder ajustar pH a 7.4, posteriormente llevar al aforo en un matraz volumétrico de 2 L y finalmente filtrar.

Para preparar el ND96 con calcio, es necesario agregar 3.6 mL de CaCl₂ a la solución anterior. Finalmente, se requieren 625 µL de gentamicina por cada 500 mL de solución ND96.

Determinación de la concentración de proteínas (Método Lowry)

1. Se realizó una curva de calibración de proteínas con albúmina en SSI (solución salina isotónica) en un rango de concentraciones de 0.06 a 2 mg/mL.
2. Se prepararon 2 diluciones de la muestra (1:10 y 1:20). Para la cuantificación se usó el kit BioRad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del proveedor.
3. Se leyó la absorbancia de la muestra a 750 nm, usando un espectrómetro UV.