



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE UN MOTIVO DE DILEUCINA EN EL CANAL
DE POTASIO GIRK5. ESTUDIO POR FIJACIÓN DE VOLTAJE CON
DOS MICROELECTRODOS EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA IVETH RANGEL GARCÍA

TUTOR

DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL CÓMITE TUTOR

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2013



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.

IDENTIFICACIÓN DE UN MOTIVO DE DILEUCINA EN EL CANAL DE POTASIO GIRK5. ESTUDIO POR FIJACIÓN DE VOLTAJE CON DOS MICROELECTRODOS EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez en el Edificio A de Investigación, Laboratorio 510, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Carolina Salvador Hernández en los experimentos de Biología Molecular.

El apoyo financiero para la realización del trabajo experimental corrió a cargo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de la DGAPA.

Proyecto No. IN224406. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y una beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (IN202110).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día Febrero de 2013.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Juan Carlos Gómora Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. León David Islas Suárez	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio López González	Instituto de Biotecnología, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez por su orientación en la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez y a la Dra. Martha Robles Flores por su asesoría y valiosas observaciones.

Al jurado de Examen de Maestría Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dr. León David Islas Suárez, Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, Dr. Ignacio López González por sus observaciones a esta tesis.

A la M. en C. Carolina Salvador Hernández por su apoyo y su aportación en la realización de esta tesis.

A la Fundación para la Acidosis Tubular Renal Infantil Mexicana, AC” (FUNATIM) por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

A mis amigas y compañeras de laboratorio: cDr. Beatriz Díaz, cDr. Zinaeli López, cDr. Liliana Pérez por su asesoría y por compartir conmigo su conocimiento.

A mis Amigos y compañeros de laboratorio: Dr. Rolando Carrizosa, cDr. Antonio Romano, QFB Teresa Padilla por su apoyo.

En especial quiero **AGRADECER** y **DEDICAR** esta Tesis a mis padres “**Gloria García Bautista y Victorino Rangel Huerta**” por su infinito amor, por su paciencia y sobre todo **POR EL GRAN APOYO** que me han dado durante todo este largo recorrido.

A mis queridos hermanos “**Dulce, José Luis y Monserrat**” porque siempre están a mi lado alentándome continuamente; y a mis amados sobrinos: Fernando, Carolina y Jennifer por quererme tanto. A mi tío Agustín García Bautista (†) porque donde quiera que esté, siempre cuento con su apoyo.

A todos mis familiares por creer en mí: Familia García Bautista y Familia Rangel Huerta

A mis amigos “Patricia, Belen, Fanny, por apoyarme durante todo este tiempo de conocernos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de Maestría en sus instalaciones.

Al Facultad de Medicina por la oportunidad que me ofreció para la realización de esta Tesis.

Índice	Pag.
1. Resumen	6
2. Abreviaciones	8
3. Introducción	10
4. Canales iónicos	10
5. Expresión de canales iónicos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	11
6. Electrofisiología.	12
6.1. Propiedades eléctricas de las membranas biológicas	12
6.2. Métodos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos.	13
6.3. Fijación de Voltaje (<i>Voltage Clamp</i>).	14
6.4. Fijación de voltaje con dos microelectrodos	15
7. Canales de potasio	16
7.1. Los canales de K ⁺ rectificadores entrantes (Kir).	17
7.2. Rectificación entrante.	18
7.3. Estructura y clasificación de los canales Kir.	20
7.4. Subfamilia Kir 3 (GIRK).	21
7.5. Activación por proteínas G heterotriméricas	22
7.6. Distribución y función de los canales Kir3 (GIRK).	24
8. Tráfico Vesicular Intracelular de Proteínas.	27
8.1. Rutas del tráfico para la distribución de las proteínas.	27
8.1.1. Ruta biosintética–secretora	27
8.1.2. Ruta endocítica	28
8.2. Motivos de distribución de las proteínas.	29
8.2.1. Motivos de distribución al sistema endosomal-lisosomal	29
8.2.2. Motivos del tipo dileucina	30
8.3. Tráfico de los canales GIRK	31
8.3.1. Motivos de Tráfico en los Canales GIRK	31
9. Antecedentes	34
9.1. El Canal GIRK5 en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	34
9.2. Motivo de dileucina en el canal GIRK5.	36
10. Planteamiento del Problema	38
11. Hipótesis	39
12. Objetivos	40
12.1. Objetivos Generales	40
12.2. Objetivos particulares	40
13. Materiales y Métodos	41
13.1. Biología Molecular	41
13.1.1. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR para obtener los canales mutantes GIRK5	41
13.1.2. Ligación al vector PBF	42
13.1.3. Transformación.	43
13.1.4. Obtención del DNA.	43
13.1.5. Secuenciación.	44
13.1.6. Transcripción in vitro.	44
13.2. Obtención y manejo de los ovocitos.	44
13.3. Microinyección del RNA en los ovocitos.	44
13.4. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.	45

13.5. Análisis estadístico	45
14. Resultados	46
14.1. Biología Molecular	46
14.1.1. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR	46
14.1.2. Obtención de los fragmentos mutados: E17A/L21A/I22A e Y16A/I22A.	46
14.1.2.1. PCR Primaria (PCR1 y PCR2)	46
14.1.2.2. PCR combinatoria (PCR3)	46
14.2. Ligación al vector PBF	47
14.3. Obtención del cDNA.	48
14.4. Secuenciación.	49
14.5. Transcripción <i>in vitro</i>	51
14.6. Registros electrofisiológicos	52
14.6.1. Expresión de los canales mutantes en los ovocitos de la rana <i>Xenopus laevis</i> .	52
14.6.2. Registros electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.	52
14.6.3. Relación corriente-tiempo	54
14.6.4. Relación corriente – voltaje (I-V)	54
14.7. Efecto de las mutaciones puntuales en cada uno de los residuos de aminoácido en la secuencia consenso ESPQLI (EXXXLI) sobre la expresión funcional y la amplitud de la corriente entrante de los canales GIRK5.	55
14.7.1. La mutación del residuo de isoleucina (I22) de la secuencia ESPQLI produce la expresión funcional del canal GIRK5.	58
14.7.2. Efecto de mutaciones puntuales en múltiples residuos de aminoácidos en la secuencia consenso ESPQLI sobre la expresión funcional y la amplitud de la corriente de los canales GIRK5.	60
14.7.3 El cambio paulatino del motivo dileucina resulta en un aumento gradual de la expresión de los canales mutantes.	62
14.7.4. Importancia de la I22 en el motivo dileucina del canal GIRK5 en la membrana plasmática del ovocito de <i>X. laevis</i> .	65
15. Discusión	67
15.1. Papel de los residuos de aminoácido del motivo de dileucina EXXXLI en la expresión funcional de los canales GIRK5.	68
15.2. La ruptura del motivo dileucina en más de un residuo es equivalente a la expresión funcional del canal mutante GIRK5I22A.	69
15.3. La ruptura del motivo dileucina resulta en un aumento gradual de la expresión del canal GIRK5	70
15.4. Importancia de la I22 en el motivo dileucina del canal GIRK5 en la membrana plasmática del ovocito de <i>X. laevis</i> .	71
16. Conclusiones	73
17. Perspectivas	74
18. Referencias	75
Apéndice A1	81
Apéndice A2	85

1. Resumen

Los canales de potasio (K^+) rectificadores entrantes (Kir) tienen un papel importante en el control del potencial de membrana en reposo, en la regulación de la excitabilidad celular y la secreción de hormonas como la insulina. La familia Kir comprende siete subfamilias (Kir1-Kir7). Los canales de la subfamilia Kir3 también conocidos como GIRK, se caracterizan por ser activados por el dímero $G\beta\gamma$ a través de los receptores acoplados a las proteínas Gi/Go. Existen cinco miembros de esta subfamilia GIRK (GIRK1-5). Los canales GIRK de mamífero forman heteromultímeros con el GIRK1 y se distribuyen principalmente en el corazón (GIRK1/GIRK4) y el cerebro (GIRK1/GIRK2, GIRK1/GIRK3 y GIRK1/GIRK4). Los canales GIRK5 son canales endógenos de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Los canales GIRK5 poseen un residuo de tirosina (Y16) fosforilable en los primeros 25 aminoácidos de la región N-terminal. La fosforilación de la Y16 en los canales GIRK5 inhibe su expresión en la membrana celular [Mora y Escobar, 2005]. La Y16 está adyacente a un motivo del tipo dileucina EXXXLI representado por la secuencia Y16ESPQLI. Los motivos de dileucina participan en la expresión polarizada y/o en la endocitosis de proteínas de membrana en los epitelios. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de mutar cada uno de los aminoácidos del motivo de dileucina en su expresión funcional. Se realizó un “scanning” de alanina (A). Una herramienta muy útil en Biología Molecular para el estudio de la relación estructura/función de las proteínas, es la mutagénesis de sitio dirigida. Este método permite generar mutaciones específicas en sitios concretos de un gen de secuencia conocida al cambiar el codón de un aminoácido determinado por el deseado [Griffiths, et al 2002]. La sustitución es dirigida en aminoácidos específicos que se consideran importantes en determinar la función de la proteína [Raffa, 2002, He, et al. 2004]. La estrategia de la mutagénesis del “scanning” de alanina (A) consiste en la sustitución sistemática de un aminoácido de una proteína nativa o silvestre “wild-type” (canal iónico o receptor) por un residuo de alanina (A) [Cunningham y Wells, 1989]. Cada sustitución produce una mutante del canal iónico o receptor silvestre [Raffa, 2002]. La alanina (A) es elegida como un sustituyente porque su cadena corta lateral no polar de metileno no altera significativamente el plegamiento de la proteína. ; y no impone un efecto electrostático o un efecto estérico [Cunningham y Wells, 1989].

Además, la alanina (A) es el aminoácido que más común en las proteínas; y se encuentra tanto en posiciones ocultas y expuestas al disolvente [Hébert et al. 1991].

Para simular la desfosforilación, se incluyó también la mutación de la Y16. Se registraron las corrientes macroscópicas de los canales mutantes en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Los canales mutantes E17A, S18A, P19A, Q20A, L21A y Q23A no produjeron corrientes. En contraste los canales mutantes I22A, L21A/I22A y E17A/L21A/I22A y los que contienen la mutación de la tirosina 16: Y16A/I22A, Y16A/L21A/I22A, Y16A/E17A/L21A/I22A mostraron amplitudes de corriente de rectificación entrante similar. Los registros electrofisiológicos mostraron que el residuo de isoleucina I22 tiene un efecto dominante para la función del motivo dileucina "EXXXLI". E17, L21 e I22 actúan de forma cooperativa cuando la Y16 no está fosforilada.

2. Abreviaciones

5HT _{1A}	Receptor de serotonina
A ₁	Receptor de adenosina
AP	Complejo Adaptador (adaptor complex)
C _m	Capacitancia de la membrana
C-terminal	Región del carboxilo terminal
D ₂	Receptor dopaminérgico
DH5 α	Células competentes de una cepa de E. coli
EGFP	Proteína de fusión verde fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein)
E _K	Potencial de equilibrio para el ión K ⁺
G α	Subunidad α de las proteínas G heterotriméricas
G β	Subunidad β de las proteínas G heterotriméricas
G γ	Subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas
G α_{12} /G α_{13}	Subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas que activan a la fosfolipasa A2
G α_i /G α_0	Subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas que inhiben a la adenilato ciclasa
G α_q /G α_{11}	Subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas que activan a la fosfolipasa C
G α_s	Subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas que activan a la adenilato ciclasa
GABA _B	Receptor ácido γ -aminobutírico B
Gating	Mecanismo de compuerta
GIRK	Canales de potasio regulados por proteínas G heterotrimericas (G protein-gated, inwardly rectifying potassium channel)
GLUT	Transportador de glucosa (Glucose Transporter)
HGNC	Organización del genoma humano HUGO (HUGO Gene Nomenclature Committee)
HP	Potencial de mantenimiento (holding potencial ,)
<i>I_c</i>	Corriente capacitiva
ICl-Ca	Canales de cloro dependientes de Ca ²⁺ (Ca ²⁺)-activated Cl ⁻ channel)
<i>I_i</i>	Corriente iónica
<i>I_m</i>	Corriente total de la membrana
KCNJ	Canales de potasio (K ⁺) rectificadores entrants (The inward rectifier family of potassium channels)
Kir	Canales de potasio (K ⁺) rectificadores entrantes (Inwardly Rectifying Potassium Channels)
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje (Voltage-Gated Potassium Channels)
LB	Medio de cultivo para bacterias (Luria Bertani)
LDLR	Receptor de la lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein Receptor)
m ₂	Receptor muscarínico
N-terminal	Región del amino terminal

P	Región del poro
Patch Clamp	Técnica electrofisiológica de fijación de segmentos de membranas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4-5-bifosfato
Q	Cantidad de carga almacenada
RGSs	Las proteínas reguladoras de la señalización mediada por las proteínas G (Regulators of G protein signalling)
R _m	Resistencia de la membrana
TCR	Receptor de células T (T-cell receptor)
TEVC	Técnica electrofisiológica de <i>fijación de voltaje con dos microelectrodos</i> (Two-Electrode Voltage-Clamp)
TGN	La red trans -Golgi.
TM	Segmentos transmembranales
V _c	Voltaje de comando (<i>voltage command</i>)
V _m	Potencial de membrana
Voltage Clamp	Técnica electrofisiológica conocida como fijación de voltaje
V _{rev}	Voltaje de inversión
α ₂	Receptor adrenérgico

3. Introducción

Los iones pueden atravesar las membranas celulares por medio de proteínas de membrana como son las bombas, los transportadores y los canales iónicos. Los canales iónicos facilitan el paso de los iones a través de la membrana a una velocidad 10^8 veces superior a la de cualquier transportador. Los canales iónicos no solo se restringen a las membranas de las células excitables sino que también están presentes en todas las células de animales, plantas y microorganismos; también se encuentran en las membranas intracelulares de los organelos [Alberts, *et al.* 2002; Hille, 2001; Aidley y Stanfield, 1998]. Una célula necesita modular y regular el nivel de expresión de los transportadores, receptores y canales iónicos en su membrana plasmática para mantener su homeostasis, tanto estructural como funcional, detectar cambios ambientales y comunicarse con otras células [Gong, *et al.* 2007]. La función normal de estas proteínas depende no solo del control de su actividad en la membrana plasmática sino también de la regulación de su número (abundancia) en la membrana plasmática. La endocitosis es uno de los mecanismos que promueve la rápida y eficiente internalización de muchas proteínas de membrana plasmática.

4. Canales iónicos

El transporte mediado por los canales iónicos es siempre pasivo por lo que los iones pueden difundir rápidamente a favor de los gradientes electroquímicos a través de la bicapa lipídica [Hille, 2001; Aidley y Stanfield, 1998]. Los canales iónicos tienen varias propiedades que los hacen muy eficientes en el control de la permeabilidad de los iones:

- 1.- Tienen un poro acuoso que puede abrirse por cambios conformacionales para dejar pasar hasta 100 millones de iones por segundo [Aidley y Stanfield, 1998].
- 2.- Presentan selectividad: permiten solo el paso de cierto tipo de ión, con exclusión de otros.
- 3.- Varían considerablemente en su mecanismo de compuerta o “*gating*” responsable de su apertura y cierre. La apertura de los canales iónicos resulta de los cambios conformacionales del canal que pueden ser iniciados en respuesta a cambios en el voltaje a través de la membrana (canales dependientes de voltaje), por la unión a un ligando como neurotransmisores y hormonas o por segundos mensajeros citoplasmáticos (canales

dependientes de ligando) o por estrés mecánico (canales regulados por tensión) [Molleman, 2002; Alberts, *et al.* 2002; Aidley y Stanfield, 1998].

5. Expresión de canales iónicos en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de la rana sudafricana *Xenopus laevis* normalmente son usados en investigación biológica, farmacológica y electrofisiológica (señalización intracelular, rutas bioquímicas y transporte). Los ovocitos son óvulos inmaduros que bajo el estímulo hormonal adecuado salen del arresto y se preparan para su fertilización. Los ovocitos atraviesan por seis estadios de maduración (I-VI). Para la mayoría de los experimentos, los ovocitos de *X. laevis* en los estadios V - VI son óptimos porque son grandes (1-1.3 mm de diámetro) por lo que facilitan la inyección del ARNm y la inserción de micro-electrodos (**Figura 1**). Los ovocitos presentan una región pigmentada en café oscuro llamada el polo animal y una región blanca (no pigmentada) llamada polo vegetal [Gurdon, *et al.* 1971, Stühmer, 1992; Bianchi y Driscoll, 2006].

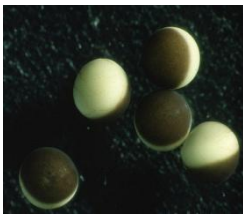


Figura 1. Ovocito en los estadios V-VI. Los ovocitos tienen dos regiones distintas: el polo “vegetal” blanco y el polo “animal” café oscuro.

bitesizebio.com

Gurdon, *et al.* 1971 demostró que el ácido ribonucleico mensajero exógeno (ARNm) inyectado en los ovocitos de *X. laevis* puede ser traducido y expresar la proteína funcional incluyendo modificaciones post-traduccionales. Miledi (1983) utilizó los ovocitos para la expresión de receptores y canales iónicos [Miledi, *et al.* 1983].

La ventaja principal del uso de los ovocitos surge de la facilidad de su manejo y sus altos niveles de expresión de las proteínas exógenas (Tzounopoulos, *et al.* 1995). Junto con su capacidad para traducir eficazmente ARNm exógeno a proteínas, los ovocitos de *Xenopus* tiene otras ventajas experimentales: 1) la rana *Xenopus laevis* es fácil de mantener en cautiverio, por lo que es un animal de laboratorio de bajo costo, 2) los ovocitos se manejan con facilidad debido a su diámetro (1-1,3 mm), 3) los ovocitos se mantienen durante 4-5 días en un incubador, 4) los ovocitos expresan un bajo número de transportadores y canales iónicos endógenos, 5) pueden inyectarse varios ARNm simultáneamente para el estudio de

multi-complejos de proteínas, y 6) las técnicas electrofisiológicas son fácilmente aplicables [Gurdon, *et al.* 1971; Bianchi y Driscoll, 2006].

Los canales iónicos endógenos principales incluyen a los de Cl^- dependientes de Ca^{2+} [Miledi 1982], de Ca^{2+} dependientes de voltaje [Miledi, 1982; Barish, 1983], de potasio del tipo rectificador tardío [Lu, *et al.* 1990] y de potasio del tipo rectificador entrante [Bauer, *et al.* 1996]. Los canales iónicos exógenos en los ovocitos se pueden caracterizar electrofisiológicamente por técnicas como fijación de voltaje con dos microelectrodos para el registro de la célula completa. Los canales iónicos exógenos pueden distinguirse claramente de los endógenos ya que las corrientes generadas por los canales iónicos endógenos son insignificantes comparadas con las producidas por los canales recombinantes [Rigel, 1990; Stühmer, 1992; Weber, 1999].

6. Electrofisiología.

6.1. Propiedades eléctricas de las membranas biológicas

Las membranas biológicas presentan propiedades similares a las de un circuito eléctrico (Figura 2).

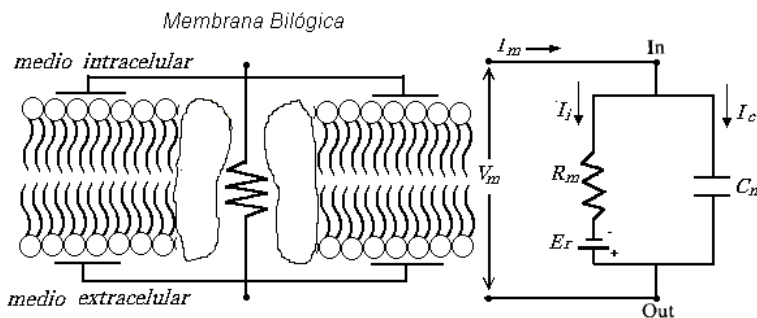


Figura 2. Representación del circuito eléctrico equivalente a la membrana biológica. Los parámetros se dan en el texto.

[Modificado de Johnston y Miao-Sin Wo, 1995]

La bicapa fosfolipídica es una barrera efectiva para el movimiento de partículas cargadas. En contraste, el medio intracelular y extracelular son medios conductores de los iones. Así, la membrana forma un aislante entre dos conductores, por lo que se comporta como un capacitor. Un capacitor puede almacenar carga. El potencial de membrana indica que el lado intracelular es más negativo que el lado extracelular; ambos lados ejercen un campo electromagnético a través de la membrana, que atrae partículas cargadas, los iones negativos (aniones) en el citosol son atraídos por las cargas positivas del exterior y se

acumulan cerca de la membrana, mientras que los iones positivos (cationes) se apilan en la superficie. La cantidad de carga almacenada puede ser calculada por

$$Q = V_m C$$

donde Q es la carga almacenada, V_m es la diferencia de potencial a través de la membrana y es la C capacitancia de la membrana.

Esta ecuación muestra que la capacitancia de la membrana es una medida de la capacidad de la membrana para almacenar carga en un potencial dado [Molleman, 2003]. El aislante eléctrico no es perfecto ya que están los canales iónicos y los transportadores. En otras palabras la resistencia de la membrana (o su recíproca, la conductancia) representa la permeabilidad (la mayor o menor facilidad con que la membrana permite el paso de los iones) a través de la membrana [Molleman, 2003; Johnston y Miao-Sin Wo, 1995]. El movimiento de los iones por los canales iónicos (R) produce una corriente I en respuesta a una diferencia de potencial (V) de acuerdo a la **Ley de Ohm**

$$I = \frac{V}{R} = GV$$

donde G es la conductancia

De la **figura 2** se puede escribir la ecuación diferencial para la corriente total, I_m , está compuesta por la corriente capacitiva, I_c (descarga y descarga del capacitor de la membrana) y por la corriente iónica, I_i , (canales). C_m es la capacitancia de la membrana y V_m es el potencial de membrana. [Johnston y Miao-Sin Wo, 1995; Kettenmann y Grantyn, 1993]

$$I_m = I_c + I_i = C_m \frac{dV_m}{dt} + I_i$$

6.2. Métodos electrofisiológicos para el estudio de los canales iónicos.

Los canales iónicos pueden ser expresados en varios sistemas de expresión heteróloga tales como líneas celulares de mamífero u ovocitos de rana. Como los iones son partículas cargadas eléctricamente, los cambios en la corriente a través de la membrana plasmática pueden ser medidos cuando los canales iónicos se abren y se cierran. Esta corriente se puede medir por varias técnicas electrofisiológicas.

6.3. Fijación de Voltaje (*Voltage Clamp*).

La técnica de fijación de voltaje permite que el potencial de membrana de una célula se pueda fijar en un valor constante y que la corriente que fluye a través de la membrana se pueda medir en cualquier potencial particular.

La actividad de los canales iónicos se puede registrar por la técnica conocida como fijación de voltaje (*Voltage Clamp*), primero ideada por Marmont y Cole y desarrollada y aprovechada por Hodgkin y Huxley en 1952 para trabajar con el axón gigante de calamar. Esta técnica permite registrar solo la corriente iónica, I_i , a través de los canales iónicos y se elimina la corriente capacitiva, I_c . Para lograrlo se mantiene el potencial de membrana en un valor constante y la corriente capacitiva es entonces igual a cero:

$$I_c = C \frac{dV_m}{dt} = 0$$

El principio de esta técnica consiste en inyectar una corriente que sea igual en amplitud pero de signo opuesto a la corriente que fluye a través de la célula. Esto da como resultado que no haya flujo neto de corriente a través de la membrana y el potencial de membrana se mantiene constante. Por lo tanto, midiendo la corriente que ha sido inyectada para fijar el potencial, se puede determinar la corriente que fluye a través de la membrana. La fijación de voltaje ocurre a través de un amplificador de retroalimentación que mantiene el potencial de membrana constante en el valor deseado y se mide la corriente iónica I_i , que corresponde al paso de iones por los canales iónicos. [Aidley y Stanfield, 1998; Johnston y Miao-Sin Wo, 1995].

En el sistema de retroalimentación el potencial de membrana que se mide se compara con un potencial de mantenimiento que establece el investigador (*holding potencial, HP*). Cualquier cambio del potencial de membrana registrado a partir del *HP*, se corrige instantáneamente por inyección de corriente compensatoria para mantener el potencial deseado en el circuito constituido por la membrana plasmática. Esta corriente es entonces una representación exacta en magnitud (pero opuesta en signo) de la corriente iónica de los canales iónicos, por lo que, la corriente iónica necesaria para mantener un potencial dado es el parámetro medido [Molleman, 2003; Stühmer, 1992]. Las corrientes registradas son las corrientes sumadas de varios centenares de canales o más, éstas son llamadas corrientes macroscópicas. [Aidley y Stanfield, 1998].

Se utilizan una variedad de diferentes métodos de fijación de voltaje: La técnica de fijación de segmentos de membranas (Patch Clamp) y la técnica *fijación de voltaje con dos microelectrodos* (Two-Electrode Voltage-Clamp (por sus siglas en inglés; TEVC)). La elección del método depende en gran medida del tamaño y de la forma de la célula [Halliwell, 1994].

6.4. Fijación de voltaje con dos microelectrodos

La expresión de proteínas de membrana después de la inyección de ARN en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* es una forma común y fácil para estudiar las corrientes eléctricas con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Es usual tener dos microelectrodos intracelulares (*fijación de voltaje con dos microelectrodos*), uno para registrar el voltaje y otro para inyectar corriente (**Figura 3**). La técnica obviamente requiere células grandes y por ello se aplica en los ovocitos. Este procedimiento se realiza repetidamente, en intervalos de tiempos moderados, el potencial de membrana puede ser despolarizado o hiperpolarizado desde HP, hasta un valor del potencial de membrana predeterminado que puede variar (*voltage command, V_c*) por ejemplo desde -100 mV hasta 100 mV; y registrar la cinética de las corrientes iónicas [Molleman, 2003; Aidley y Stanfield, 1998].

La mayoría de los circuitos de fijación de voltaje también usan un electrodo de referencia para la solución del baño. Esto evita errores de polarización que surgen de la corriente que pasa a través del electrodo conectado a la tierra [Stühmer, 1998].

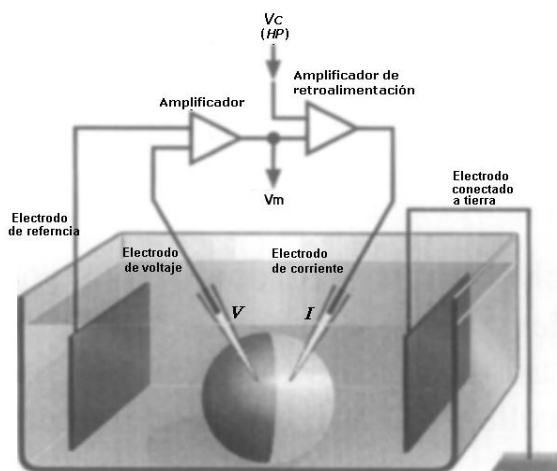


Figura 3. Circuito de fijación de voltaje con dos microelectrodo en ovocitos de *Xenopus laevis*. Electrodo que registra el potencial (V) y el electrodo que inyecta corriente (I) están insertados en la célula bajo investigación en una solución salina fisiológica. [Modificado de Stühmer, 1998].

V_m : Potencial transmembranal

V_c : Comando de voltaje

HP: Potencial de mantenimiento.

En esta configuración el potencial transmembranal (V_m) se toma como la diferencia entre el electrodo que registra el potencial intracelular (V) y el electrodo de referencia. V_m es comparado con el potencial de mantenimiento o con el potencial comando, y cualquier diferencia es inyectada en el ovocito a través del electrodo de corriente. Esta corriente se elimina a través del electrodo conectado a tierra. Si V_m es igual a V_c o V_p , no fluye corriente a la conexión a tierra. [Stühmer, 1998].

7. Canales de potasio

Los canales iónicos más abundantes son los que permiten el paso de iones K^+ . Los canales de K^+ son una familia diversa y ubicua de proteínas transmembranales presentes en células excitables y no excitables. Los miembros de esta familia de canales juegan un papel crítico en los procesos de señalización celular que regulan la liberación de neurotransmisores, la frecuencia cardíaca, la secreción de insulina, la excitabilidad neuronal, el establecimiento de los potenciales de membrana en reposo, el transporte de electrolitos epiteliales, contracción del músculo liso, y la regulación del volumen celular. Los canales de K^+ conducen selectivamente los iones K^+ a través de la membrana plasmática bajo su gradiente electroquímico a una tasa de 10^6 a 10^8 iones/s [Gutman, et al. 2005, MacKinnon, 2003]. Se han identificado más de 200 genes que codifican para diferentes proteínas relacionadas con los canales de K^+ y 90 genes en el genoma humano. [Shieh, et al. 2000]. Los canales de K^+ establecen el potencial de membrana en el reposo [Adams et al, 2004]. El potencial de membrana de la mayoría de las células es muy cercano al potencial de equilibrio para el K^+ debido a que sus membranas en el reposo son permeables al K^+ [Bolsover, *et al.* 2004].

Los canales de potasio se encuentran compuestos de subunidades formadoras del poro, también referidas como subunidades α , en algunos casos, se acompañan de subunidades auxiliares, conocidas como subunidades β . La subunidad α es la responsable de la conducción iónica [Heginbotham et al. 1994]. La subunidad β altera las propiedades electrofisiológicas o biofísicas, los niveles de expresión [Gutman et al., 2005]. Los canales de K^+ funcionales son homo o heterotetrámeros formados por la combinación de cuatro subunidades α que se asocian y forman el poro (**P**, **Tabla 1**). La región del poro comprende de un filtro de selectividad y corresponde a la secuencia “TVGYG” altamente conservada.

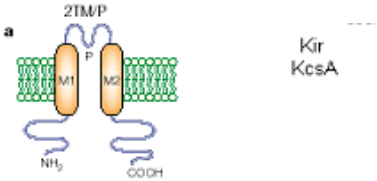
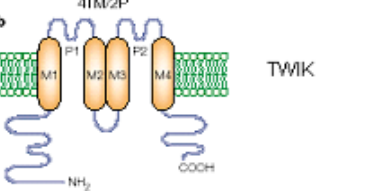
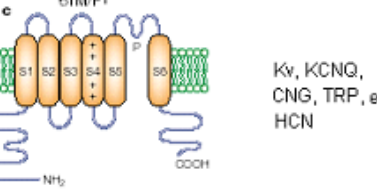
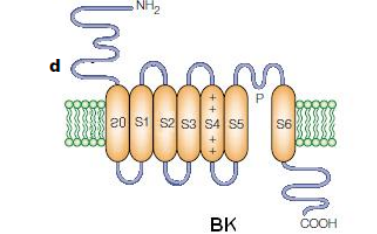
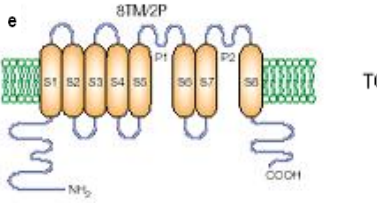
Esta secuencia es responsable de la selectividad a los iones K^+ [Doyle, *et al.* 1998; Mackinnon, 2003, Gutman *et al.*, 2005].

Existe una gran variedad de canales de K^+ que se diferencian por sus propiedades farmacológicas y topológicas. La topología de la subunidad α de los canales de K^+ abarca desde dos, cuatro, seis, siete y ocho segmentos transmembranales (**Tabla 1**).

7.1. Los 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. Debido a que el tipo de rectificación que se conocía hasta entonces era la de los canales de K^+ rectificadores tardíos K_v , a los canales Kir se les denominó rectificadores anómalos [Hille, 2001]. La anomalía se refirió a un incremento de la conductancia de K^+ durante la hiperpolarización y una disminución de la conductancia durante la despolarización [Hille, 2001, Bichet, *et al.* 2003]. El papel fisiológico de los canales Kir es mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ión K^+ (E_K); por tanto, regulan la excitabilidad celular, la secreción de insulina, controlan la frecuencia cardiaca, modulan la transmisión sináptica, el tono vascular y mantienen el balance electrolítico [Bichet, *et al.* 2003; Lu, 2004]. La membrana plasmática de la mayoría de las células en el reposo es muy permeable al K^+ , por lo que el potencial de membrana es muy cercano al potencial de equilibrio para el ion K^+ [Bolsover, *et al.* 2004]. Algunos de estos canales pueden ser modulados en forma indirecta por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos celulares [Hille, 2001]. También son regulados por elementos intracelulares y membranales como son los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, el ATP, las cinasas, el pH, las proteínas G heterotriméricas y lípidos, entre otros [Bichet, *et al.* 2003; Ruppersberg, 2000].

Tabla 1. Topología de los canales de potasio. Se muestra las cuatro principales clases de canales de potasio respecto al número de segmentos transmembranales TM, las regiones del poro (P) que presentan y la familia a la que pertenecen.

Clasificación de los canales de K ⁺	Esquema de la topología de los canales de K ⁺ [Modificada de Choe, 2002].
<p>Canales de K⁺ 2TM/P</p> <p>Constan de dos segmentos transmembranales (M1 y M2) con la región del poro (P) entre ellos 1a[Choe, 2002; Bichet, <i>et al.</i> 2003].</p>	
<p>Canales de K⁺ 4TM/2P</p> <p>Canales con cuatro segmentos transmembranales y dos regiones del poro (P). Se les conoce como canales de fuga. [Biggin, <i>et al.</i> 2000].</p>	
<p>Canales de K⁺ 6TM/P</p> <p>Canales que presentan seis segmentos transmembranales y una región P [Aidley y Stanfield, 1998; Hille, 2001].</p>	
<p>Canales de K⁺ 7TM/P</p> <p>Únicamente los canales de potasio activados por Ca²⁺ de alta conductancia (BK) presentan siete segmentos transmembranales y una región P [Hille 2001].</p>	
<p>Canales de K⁺ 8TM/2P</p> <p>Canales con ocho segmentos transmembranales y dos dominios del poro (P). Estos canales se han identificado únicamente en las levaduras (Choe, 2002).</p>	

7.2. Rectificación entrante.

Bajo condiciones experimentales, la “rectificación entrante” describe la propiedad de los canales de K⁺ para actuar como una válvula, los canales Kir permiten el movimiento de los iones K⁺ hacia el interior de la célula a valores de potencial de membrana por debajo del E_K

(voltajes hiperpolarizantes) y prácticamente no permiten que los iones de K^+ salgan de la célula a voltajes por arriba de E_K (voltajes despolarizantes) [Hille, 2001, Bichet, *et al.* 2003] (Esquema 12). El mecanismo de compuerta de los canales Kir depende principalmente de la concentración de K^+ externo y del potencial de membrana (E_m) [Hagiwara y Yoshii, 1979; Matsuda, 1991; Kubo, 1996]. Al aumentar la concentración de K^+ externo, la amplitud de la corriente de los canales aumenta y el voltaje de inversión (V_{rev}) de la corriente se desplaza a voltajes positivos en relación con el potencial de equilibrio para el K^+ (E_K) [Hagiwara y Yoshii 1979, Lu 2004, Habino et al, 2010]. Para ser más precisos, la relación entre la corriente y el voltaje no es lineal sino que rectifica o cambia de pendiente en el potencial de inversión (V_{rev}) y donde la corriente invierte su polaridad a un valor de cero y V_{rev} llega a ser igual E_K (**Figura 4**).

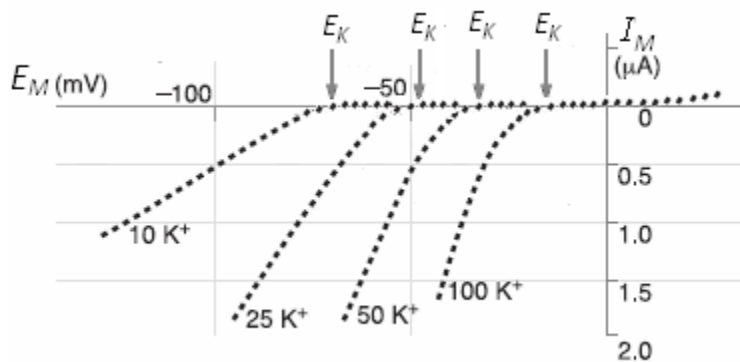


Figura 4. Efecto de la concentración de K^+ externo en los canales Kir. Relación corriente-voltaje (I-V) en ovocitos de estrellas de mar en un medio libre de Na^+ con cuatro diferentes concentraciones de K^+ externo. [Modificado de Habino et al, 2010].

La rectificación entrante resulta del bloqueo interno dependiente del voltaje por el ión Mg^{2+} intracelular y por poliaminas citosólicas como la espermina y espermidina [Matsuda, *et al.* 1987; Lopatin, *et al.* 1994; Bianchi, *et al.* 1996; Lu, 2004]. Cuando el potencial de membrana se hace más despolarizante aumenta la afinidad de los canales rectificadores entrantes por el Mg^{2+} y las poliaminas intracelulares, éstas físicamente bloquean la permeabilidad de K^+ al unirse a residuos localizados en los segmentos transmembranales y regiones citoplasmáticas de los canales [Nichols and Lopatin, 1997]. Parte de esta rectificación parece ser intrínseca y ocurre en menos de 1 ms [Hille, 2001]. Los canales Kir carecen de un sensor de voltaje clásico, a pesar de que su actividad es dependiente del voltaje [Zylbergold, et al. 2010].

Entre miembros de la familia Kir hay rectificadores fuertes (Kir2 y Kir3), rectificadores intermedios (Kir4) y rectificadores débiles (Kir1 y Kir6) (**Figura 5**). El grado de rectificación está relacionado con la afinidad de los bloqueadores catiónicos al canal. Los estudios de la cinética del bloqueo por Mg^{2+} y espermidina, además del análisis mutacional, indicaron que hay más de un sitio de unión para el bloqueo en los canales Kir. La presencia de un residuo de aspartato (D172) en Kir 2.1, altamente conservado en el dominio M2, es crucial para la rectificación [Bichet, *et al.* 2003; Lu, 2004]. Los rectificadores débiles como los Kir1.1 poseen una asparagina (N171), en lugar del aspartato presente en el canal Kir2.1 (D172). Además, los residuos de glutamato (E224 y E299) en el C-terminal del canal Kir2.1 también intervienen en el proceso de rectificación de los canales Kir [Yang *et al.* 1995, Lu 2004]. Los aminoácidos D172, E224 y E229 en Kir 2.1 actúan en forma cooperativa [Lu 2004]. Por otra parte, se identificó que el residuo de serina en el M2 (S165 en Kir2.1) es importante para el bloqueo por el Mg^{2+} pero no para el bloqueo con las poliaminas [Bichet, *et al.* 2003].

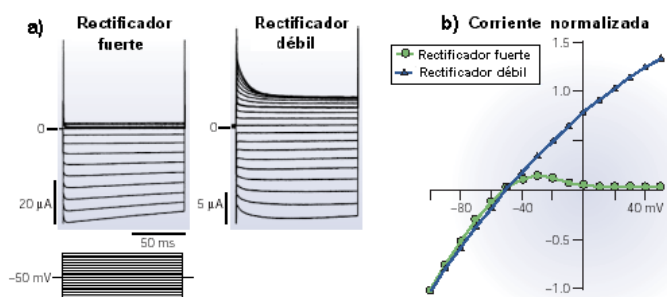


Figura 5. Rectificación entrante. a) Relación corriente–tiempo (I–T) y b) relación corriente–voltaje (I–V) de un rectificador entrante fuerte y uno débil. El protocolo de pulsos consiste en pasos de voltaje de -140 mV a $+50$ mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -50 mV. [Modificada de Bichet, *et al.* 2003]

7.3. Estructura y clasificación de los canales Kir.

Los canales Kir se agregan en homotetrámeros o heterotetrámeros para formar un canal funcional (**Figura 6 B y C**) [Bichet, *et al.* 2003]. Cada subunidad alfa se encuentra formada por dos hélices transmembranales (M1 y M2). Entre los segmentos M1 (hélice externa) y M2 (hélice interna) se encuentra la región que forma el poro (P). Tanto el amino (N) como el carboxilo (C) terminal son citoplasmáticos. (**Figura 6A**) [Ho, *et al.* 1993; Kubo, *et al.* 1993]. En 1993 el grupo de Ho y de Kubo reportaron la clonación de los primeros canales Kir. Doupnik y colaboradores (1995) agruparon a los canales Kir en varias subfamilias con base en la homología de su secuencia de aminoácidos y sus propiedades (**Figura 7**).

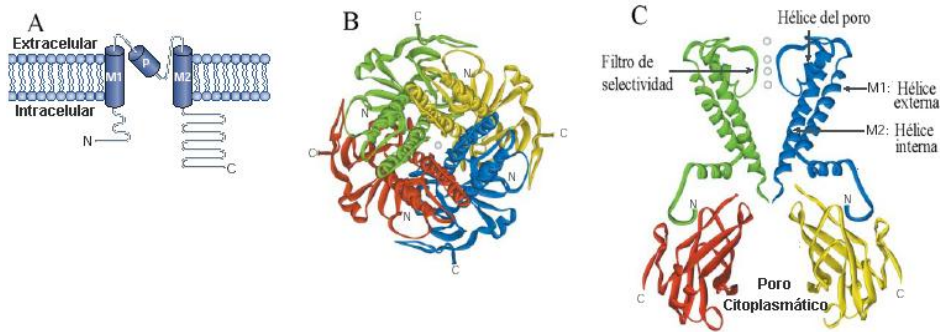


Figura 6. Topología de los canales Kir. A) Representación esquemática de una subunidad α . Segmentos transmembranales (M1 y M2), región del poro (P). B) Vista extracelular del tetrámero de un canal Kir. C) Muestra el arreglo de los dominios transmembranales de dos subunidades α del canal. Las esferas representan los iones K^+ en el filtro de selectividad. [Modificado de Bichet, et al. 2003]

Hasta la fecha se han identificado siete subfamilias (Kir1 - Kir7). La organización del genoma humano (HUGO) asignó la nomenclatura de KCNJ para los canales Kir. Esta nomenclatura no se basa en las características estructurales de los canales ni en la relación filogenética que existe entre estas proteínas [Gutman et al. 2003]. Los canales Kir se expresan en células excitables (cardiomiocitos, neuronas) y no excitables (ovocitos), páncreas, testículo, riñón y pulmón. Las características de cada subfamilia son identificadas por sus distintas propiedades biofísicas, como el grado de rectificación y la conductancia unitaria; y por su sensibilidad a diferentes moduladores (**Tabla 2**).

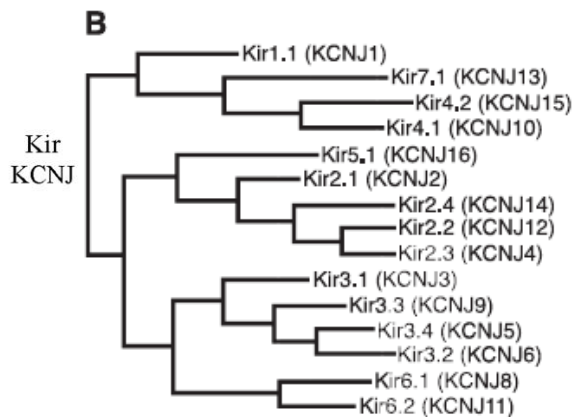


Figura 7. Árbol filogenético de los canales Kir. Entre corchetes se muestra la nomenclatura de los canales Kir (KCNJ) según la organización del genoma humano “HUGO”, [Modificada de Gutman et al. 2003].

7.4. Subfamilia Kir 3 (GIRK).

Los canales Kir3 son mediadores de una variedad de receptores inhibitorios acoplados a proteínas G heterotriméricas G_i/G_o . Los canales Kir3 son efectores de las proteínas G

heterotriméricas, particularmente son activados directamente por el dímero $G\beta\gamma$, y es por eso que se les denomina canales GIRK. Los canales GIRK son reguladores importantes de la excitabilidad eléctrica en cardiomiocitos y neuronas [Zhang, et al. 2002; Wettschureck y Offermanns, 2005, Zylbergold, et al. 2010].

Tabla 2. Subfamilia de los canales Kir, localización y algunas características importantes.

Subfamilia	Localización	Características
¹ Kir 1.x (ROMK)	Riñón de rata, Cerebro, Riñón	-Rectificadores débiles -Un sitio de unión a fosfatos en la región del C-terminal -Forman homomultímeros funcionales. -Conductancia unitaria es de 30 pS
² Kir 2x (IRK)	Corazón, Cerebro, Músculo esquelético	- Rectificadores fuertes - Forman homomultímeros funcionales - Conductancia unitaria varía de 10 a 32 pS
² Kir 3 (GIRK).	Corazón, Cerebro, Tejidos endocrinos, Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	-Rectificadores fuertes -Forman heromultímeros funcionales -Activación por proteínas G
³ Kir 4	Cerebro de rata	-Forman homomultímeros funcionales -La conductancia unitaria del homomultímero es de 25.2 pS, -Sensibles al pH intracelular.
³ Kir 5	Cerebro de rata, Testículo de rata	-Forma homotetrámeros funcionales (Kir4.1/Kir5.1) -La conductancia unitaria del heterotetrámero es de 59 pS -Sensibles al pH intracelular.
⁴ Kir 6 (KATP).	Islotes pancreáticos, Corazón, Músculo esquelético	-Asociados a receptores de sulfonilurea (SUR) -Forman homomultímeros funcionales -Conductancia unitaria es de 37.3 pS -Dependientes de ATP
⁵ Kir 7	Células piramidales, Células de purkinje, Cerebro, Riñón, Estómago, Intestino delgado	-Rectificación débil -La conductancia unitaria 50 fS

1. Ho et al. 1993, Lu y Mackinnon 1994a ; 2- Kubo et al. 1993, Tang et al. 1995 ; 3- Bond et al. 1994, Tanemoto et al. 2002 ; 4- Tarasov et al. 2004, Sim et al. 2002 ; 5. Krapivinsky et al. 1998a , Partiseti et al. 1998

7.5. Activación por proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, la alfa (α), la beta (β) y la gama (γ). Las dos últimas forman un dímero estable ($G\beta\gamma$) que únicamente se disocia cuando se desnaturaliza la proteína. La subunidad $G\alpha$ tiene sitios de unión para el GDP y el dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor acoplado a las proteínas G es activado, 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 $G\alpha_{GTP}$ y $G\beta\gamma$ libres modulan la actividad de una amplia variedad de efectores como enzimas y canales iónicos. La señalización termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ que convierte el GTP en GDP. El trímero se asocia nuevamente y regresando así al estado basal. Las proteínas reguladoras de la señalización mediada por las proteínas G (RGSs o GAPs) incrementan la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$, (**Figura 8**) [Wettschureck y Offermanns 2005].

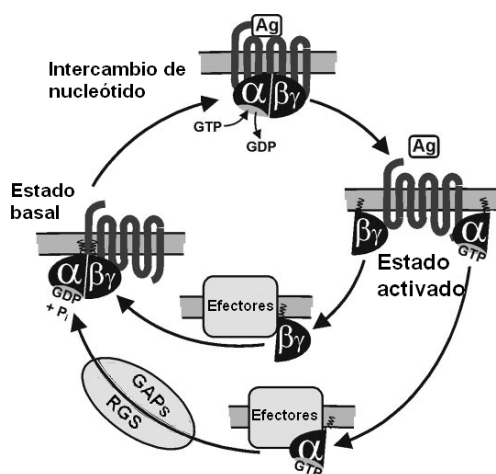


Figura 8. Ciclo funcional de la actividad de la proteína de G. Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, y la liberación del dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G heterotriméricas. La hidrólisis espontánea de GTP a GDP se puede acelerar por las proteínas GAPs o RGS. El trímero se asocia nuevamente al receptor y se reinicia el ciclo. [Modificado de Wettschureck y Offermanns 2005]

La subunidad $G\alpha$ confiere las propiedades básicas de las proteínas G heterotriméricas y se subdividen en cuatro subfamilias $G_{\alpha s}$ (activan a la adenilato ciclasa), $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ (Activan a la fosfolipasa C), $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$ (activan a la fosfolipasa A2) y $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ (inhiben a la adenilato ciclasa). En particular, los canales GIRK se activan directamente por el dímero $G\beta\gamma$ que es liberado en la activación de los receptores membranales acoplados a proteínas G del tipo G_i/G_0 (**Figura 9**) [Bichet, *et al.* 2003; Wettschureck y Offermanns, 2005].

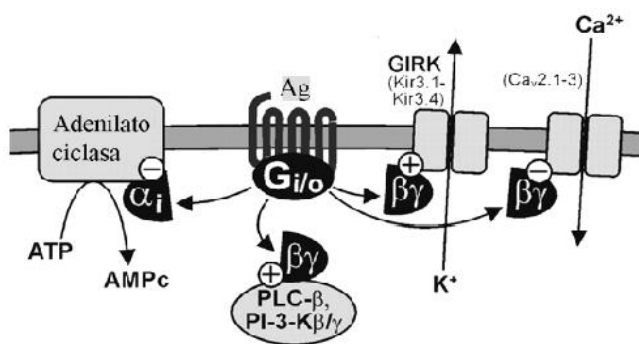
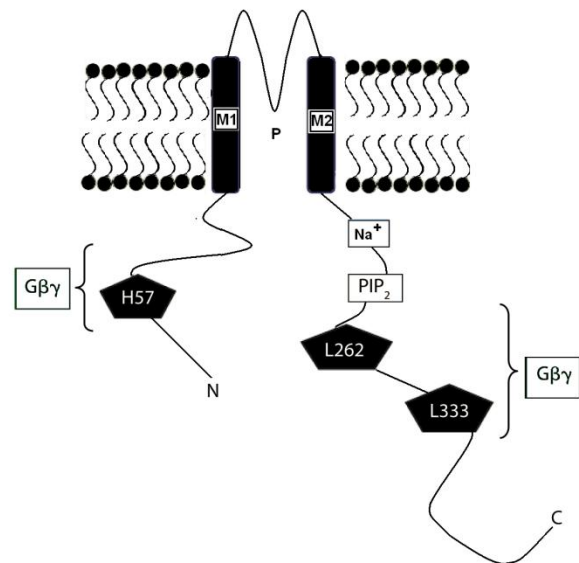


Figura 9. Vía de señalización de las proteínas $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$. Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, el trímero $G\alpha\beta\gamma$ se disocia y la subunidad $G\alpha 1$ inhibe la cascada de señalización de la adenilato ciclasa. Por su parte, el dímero $G\beta\gamma$ activa los canales GIRK. [Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005]

Cuando el receptor se activa, las proteínas heterotriméricas $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ se activan y la subunidad G_{α} inhibe a la adenilato ciclasa. Las proteínas $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ son sensibles a la toxina pertussis, la cual evita que las proteínas interactúen con el receptor [Wettschureck y Offermanns 2005]. Se ha demostrado que las subunidades $G\beta 1\gamma 2$ interactúan directamente en diversas regiones con el amino (N) y el carboxilo (C) terminal de los canales GIRK (**Figura 10**) [Huang. *et al.* 1995 y 1997].

Los receptores acoplados a las proteínas G_i/G_0 que activan a los canales GIRK son: el muscarínico m_2 , el adrenérgico α_2 , el dopaminérgico D_2 , el de serotonina ($5HT_{1A}$), el de adenosina A_1 , el de ácido γ -aminobutírico B ($GABA_B$), el de esfingosina 1-fosfato, el de somatostatina y los opioides κ , μ y δ [Werner, *et al.* 1996; Yamada, *et al.* 1998; Smith, *et al.* 2001; Hille, 2001]. Del dímero $G\beta\gamma$, la actividad de los canales GIRK está controlada por un gran número de moduladores intracelulares como el fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (PIP_2), Na^+ , eicosanoides, ATP, Mg^{2+} , y por fosforilación (**Figura 10**) [Mark y Herlitze, 2000; Bichet, *et al.* 2003].

Figura 10. Moduladores de los canales GIRK. Sitios de unión de las proteínas $G\beta\gamma$, al Na^+ y al PIP_2 , identificadas en los canales GIRK. Aminoácidos involucrados en la regulación por $G\beta\gamma$ están definidos con pentágonos negros Histidina (H), leucina (L), amino (N) y carboxilo (C) terminal [Modificada de Zylbergold, *et al.* 2010].



7.6. Distribución y función de los canales Kir3 (GIRK).

Hasta la fecha se han clonado cinco miembros de la subfamilia GIRK (Kir3.x), GIRK1–GIRK4 (Kir3.1- Kir3.4) se clonaron de mamíferos. La isoforma GIRK5 se clonó de los ovocitos de un anfibio, la rana *Xenopus laevis* [Hedin, *et al.* 1996]. Los canales de mamífero se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) y en el corazón [Karschin, *et al.* 1997; Sadjja, *et al.* 2003]. Los cuatro subunidades están bien conservadas entre las especies de mamíferos, las subunidades GIRK1-GIRK3 con ~ 98-

99% y GIRK4 con 94% de identidad en sus secuencias de aminoácidos [Zylbergold, et al. 2010]. GIRK1 se expresa en riñón, corazón y en cerebro (amígdala e hipocampo) [Schoots, et al. 1999]. GIRK3 está altamente expresado en todas las áreas del cerebro, mientras que GIRK4 se expresa principalmente en el páncreas y en menor grado en el corazón, placenta, pulmón y riñón; con una expresión insignificante en el cerebro. De los canales GIRK2 existen cuatro variantes por empalme alternativo (GIRK2-1, GIRK2A, GIRK2B y GIRK2C), se expresan en altos niveles en el cerebro, particularmente en la sustancia nigra, la amígdala y el hipocampo, donde la variante GIRK2c es más abundante [Lesage F, et al. 1994; Isomoto, et al. 1996]. El amino terminal y el carboxilo terminal son las regiones en donde se presenta la mayor diferencia entre los miembros de la subfamilia GIRK (Kir3) [Lüscher y Slesinger, 2010, Hibino, et al. 2010]. La secuencia de aminoácidos del canal GIRK5 presenta un 78% de identidad con el canal GIRK4, 72% con GIRK2, 68% con GIRK3 y solo el 56% con el canal GIRK1 [Hedin et al. 1996].

Los canales GIRK pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros. Por lo general forman heterotetrámeros que dan lugar a la formación de canales funcionales con propiedades electrofisiológicas idénticas [Dascal, 1997, Jelacic et al. 1999, Krapivinsky et al. 1995 y 1998]. Estos heterotetrámeros se forman por la combinación de dos subunidades GIRK1 con cualquiera de las subunidades de GIRKx; donde x = 2, 3 ó 4 (**Figura 11**) [Krapivinsky, *et al.* 1995; Dascal, 1997; Jelacic, *et al.* 1999]. Los homotetrámeros de la subunidad GIRK1 no pueden formar canales funcionales [Dascal, 1997, Vivadou, et al. 1997].

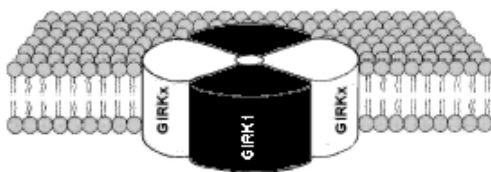


Figura 11. Tetrámero compuesto de la subunidad GIRK1 con cualquier otro miembro (GIRKX) de los canales GIRK (GIRK2-GIRK4)

Se ha demostrado que la corriente típica IK_{ACh} es producida por el heterotetrámero formado por el canal GIRK1 y el canal GIRK4. Al transfectar células del ovario de hamster chino (CHO) y por la co-expresión en ovocitos de *Xenopus* con el ADNc de los canales GIRK1 y GIRK4 se registra la corriente IK_{ACh} . Mientras que con el ADNc del canal GIRK1 no se registra la corriente [Krapivinsky et al. 1995, Chan, et al. 1996]. Además

GIRK1 y GIRK4 1 coexpresadas en ovocitos coprecipitan, proporcionando evidencia de la formación del heterotetrámero por los dos canales [Chan, et al. 1996]. Lesage y colaboradores (1995) probaron que el complejo GIRK1/GIRK2 y GIRK2/GIRK4 fueron funcionalmente expresados en ovocitos de *Xenopus* después de la inyección de ARNc de GIRK2 sólo o en combinación con RNAc GIRK1 (GIRK1- GIRK 2) o con RNAc GIRK4 (GIRK2-GIRK4). Además, presentaron evidencias del ensamble de las subunidades GIRK1 y GIRK2 en el cerebro, utilizando estrategias de co-localización, inmunoprecipitación, y electrofisiología [Lesage, et al.1995]. Los experimentos utilizando el RNAc de GIRK3 o en coexpresión con el RNAc GIRK1 (GIRK1/GIR3) no fueron funcionalmente expresados en ovocitos de *Xenopus* [Lesage, et al.1995]. GIRK2/GIRK3 forman un canal funcional en células CHO co-transfectadas; este complejo GIRK2/GIRK3 fue purificado de el tejido cerebral nativo y del sistema de expresión heteróloga [Jelacic et al. 2000]. Por otra parte, se ha identificado que el canal GIRK1 colocaliza con los canales GIRK2, GIRK3 o GIRK4 en el cerebro de ratón [Karschin et al. 1997, Ponce et al 1996].

El canal heterotetrámero GIRK1/GIRK4 (IK_{ACh}), es el canal de K^+ modulado por acetilcolina, se localiza en miocitos atriales y las células marcapasos del corazón [Kennedy, et al. 1999]. La activación del receptor muscarínico m_2 ($AChm_2$) del corazón por la acetilcolina (ACh), disminuye la frecuencia cardiaca por activación específica del canal heterotetrámero GIRK1/GIRK4 (**Figura 12**) [Loewi, 1921, Krapivinsky, et al. 1995; Dascal, 1997]. La liberación de la ACh estimula la aparición de la corriente rectificadora entrante IK_{ACh} registrada en las células marcapaso del nodo sinoauricular.

El heterotetrámero GIRK1/GIRK2 se encuentran en diferentes áreas del cerebro como corteza e hipocampo [Karschin, et al. 1994; Kobayashi, et al. 1994; Liao, et al. 1996]. GIRK1/GIRK2 media la disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios [Lüscher, et al. 1999; Signorini, et al. 1997; Wickman y Clamham 1995; Yamada. et al. 1998]. El canal heterotetrámero GIRK1/GIRK3, se expresa en diferentes regiones del cerebro y es efector de varios neurotransmisores como GABA, serotonina, y adenosina [Dascal, 1997; Wickman y Clamham, 1995; Lüscher, et al. 1999; Yamada, et al. 1998]. GIRK5 es un canal de potasio rectificador entrante endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Hedin y colaboradores (1996) clonaron el DNAc del canal GIRK5 o Kir 3.5 de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. En el ovocito el canal GIRK5 forma

homotetrámeros “GIRK5/GIRK5”. Hasta la fecha se desconoce el papel del canal GIRK5 en los ovocitos de *Xenopus laevis* pero podría influir en la maduración de los ovocitos.

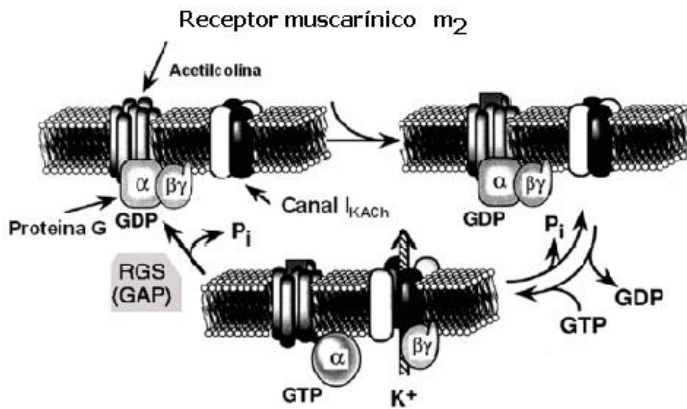


Figura 12. Ciclo de activación de los canales GIRK por las proteínas G. Activación y desactivación de los canales GIRK en respuesta a la acetilcolina (Ach). [Modificada de Yamada, *et al.* 1998]

8. Tráfico Vesicular Intracelular de Proteínas.

Una célula necesita regular el nivel de los transportadores, los receptores y los canales iónicos en su membrana plasmática para mantener su homeostasis, tanto estructural como funcional, detectar cambios ambientales y comunicarse con otras células. Las células eucariotas poseen un complejo sistema de membranas constituido por los diferentes organelos. Cada organelo tiene una composición única de proteínas, por ende, se requieren mecanismos de transporte específicos para que las proteínas se dirijan a sus respectivos sitios de función; y así asegurar la función de cada compartimento [van Vliet, *et al.* 2003].

8.1. Rutas del tráfico para la distribución de las proteínas.

A través del tráfico vesicular de proteínas en **la ruta biosintética –secretora** y **la ruta endocítica**, se genera y se mantiene la organización y estructura de la superficie celular, su biogénesis, remoción, reciclaje y restructuración (**Figura 13**).

8.1.1. Ruta biosintética–secretora: Una vez que las proteínas se sintetizan en los ribosomas unidos al RE, se incorporan al lumen o se insertan en la membrana del mismo, pueden empaquetarse dentro de las vesículas de transporte que brotan desde el RE y fusionarse entre sí para formar el ERGIC (Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment). Numerosos ERGIC geman para formar nuevas cisternas del *cis*-Golgi (*cis*, *medial* y *trans*). Las proteínas se transportan entonces a través de estas cisternas y alcanzan

a la red del *trans-Golgi*, en este sitio, las proteínas se clasifican y son enviadas hacia sus diferentes destinos: membrana plasmática (apical o basolateral), medio extracelular, gránulos de secreción y lisosomas; o son retenidas como “proteínas residentes” en RE o la red del *trans-Golgi* [Lodish, *et al.* 2004, van Vliet, *et al.* 2003]. La red del *trans-Golgi* también es el sitio donde las rutas biosintética y endocítica convergen [van Vliet, *et al.* 2003].

8.1.2. Ruta endocítica: Las vesículas endocíticas brotan desde la membrana plasmática trayendo las proteínas de membrana hacia el interior de la célula. Luego de internalizarse, algunas proteínas se transportan a los endosomas tempranos donde una clasificación extensa toma lugar. Las proteínas pueden reciclarse a la membrana plasmática (vía endosomas de reciclamiento o vía TGN) o ser transportadas al TNG o ir a lisosomas (vía endosomas tardíos) para su degradación. Así, el endosoma temprano y el TNG representan las estaciones de clasificación de la célula [Bonifacino y Traub, 2003; Lodish, *et al.* 2004; Maxfield y McGraw, 2004; van Vliet, *et al.* 2003]. La endocitosis promueve la internalización rápida y eficiente de muchas proteínas de membrana plasmática. En consecuencia, la internalización y el reclutamiento juegan un papel importante en la determinación de la densidad de las proteínas de membrana, este proceso utiliza una secuencia señal de internalización localizadas en las proteínas que permiten a la célula controlar selectivamente el nivel en su superficie de los transportadores, receptores y canales iónicos particulares [Gong, *et al.* 2007]. El proceso de internalización de componentes de membrana mejor conocido es el de la endocitosis mediada por receptor, el cual utiliza vesículas recubiertas de clatrina. El transporte de proteínas de membrana de un organelo a otro es mediado por vesículas de transporte. Hay tres tipos de vesículas revestidas bien caracterizadas que se diferencian por sus proteínas de cubierta [Nakatsu y Ohno, 2003; Lodish, *et al.* 2004; Alberts, *et al.* 2002]: **Las vesículas revestidas de COPI** (del inglés Coat protein complex I), **las vesículas revestidas de COPII** (del inglés Coat protein complex II) y **las vesículas revestidas de clatrina (Figura 13)**.

Entre las proteínas importantes que regulan el tráfico del transporte vesicular, esta el complejo de proteínas adaptadoras (del inglés **AP; adaptor-protein**). Hasta ahora se conocen cuatro complejos adaptadores (AP1-4). Los complejos AP juegan un papel importante en la selección de las proteínas de membrana, así como en la formación de la vesícula [Nakatsu y

Ohno, 2003]. Los complejos AP interactúan con los motivos de distribución requeridos para dirigir el tráfico de las proteínas en las rutas de tráfico [Kirchhausen, 2002; Lodish, *et al.* 2004, Alberts, *et al.* 2002].

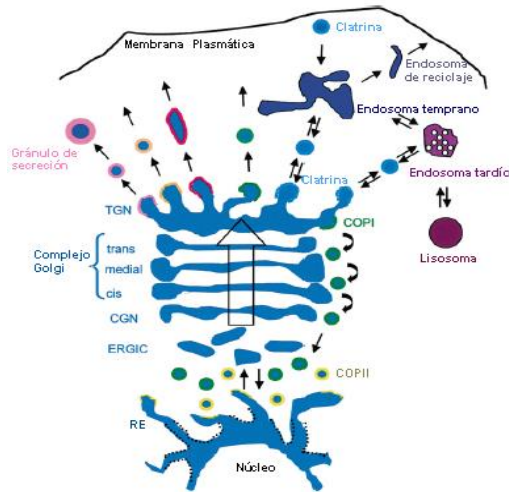


Figura 13. Rutas biosintética- secretora y endocítica de una célula eucariota. Las flechas muestran la ruta del transporte proteico. La Ruta biosintética- secretora se dirige al exterior desde el RE hacia el complejo Golgi y a la superficie celular con una desviación hacia lisosomas, mientras que en la vía endocítica se dirige hacia el interior desde la membrana plasmática. TGN: trans-Golgi network ; CGN: cis-Golgi network ; ERGIC: Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment [Modificada de van Vliet, *et al.* 2003]

8.2. Motivos de distribución de las proteínas.

La operación apropiada de estas rutas de tráfico requiere que varias señales de distribución en las proteínas se “manifiesten” a lo largo de la ruta. Estas decisiones son gobernadas por un sistema complejo de señales en las proteínas, referidas como “motivos de distribución”, ya que determinan que ruta del tráfico vesicular es usada para transportar una molécula particular, así como su transporte y los mecanismos que reconocen aquellas “señales” y que distribuyen a las proteínas a diferentes destinos finales [Kirchhausen, 2002; Bonifacino y Traub, 2003]. Algunos motivos de distribución específica se presentan en la **tabla 3**. En general los motivos consisten de cortos arreglos lineares de residuos de aminoácidos que no son secuencias conservadas sino motivos degenerados de cuatro a siete residuos de los que dos o tres son a menudo críticos para la función. Los residuos críticos son generalmente voluminosos e hidrófobos, aunque los residuos cargados también son determinantes importantes de especificidad para algunas señales [Bonifacino y Traub, 2003].

8.2.1. Motivos de distribución al sistema endosomal-lisosomal

Hasta ahora se reconocen dos clases de motivos de localización endosomal-lisosomal: las de tirosina (YXXØ; NPXY) y las de dileucina ([DE]XXXL[LI]; DXXLL) [Trowbridge, *et al.* 1993; Kirchhausen, *et al.* 1997; Dietrich, *et al.* 1997; Collins, *et al.* 2002; Bonifacino y Traub, 2003].

Tabla 3. Motivos de distribución de proteínas y las vesículas de transporte.

Motivo de Distribución	Distribución de Proteínas	Tipo de vesículas que incorporan proteínas con motivos de distribución.
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	De Golgi a RE	COPI
Lys-Lys-X-X (KKXX) S	De Golgi a RE	COPI
Manosa 6-fosfato (M6P)	De Trans-Golgi y membrana plasmática a endosomas tardíos	Clatrina /AP1
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	De membrana plasmática a endosomas	Clatrina /AP2
Tyr-X-X-Φ (YXXΦ)	De membrana plasmática a endosomas	Clatrina/AP1
		Clatrina /AP2
Leu-Leu (LL)	De membrana plasmática a endosomas	Clatrina/AP2

Modificado de Lodish, et al. 2004

Los motivos de distribución presentes en las proteínas de membrana que se dirigen principalmente al sistema endosomal/lisosomal, y sus proteínas o dominios que reconocen esta señal se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Señales de localización dirigidas al sistema endosomal/lisosomal y sus proteínas de reconocimiento.

Tipo de señal	proteínas o dominios de reconocimiento	Funciones
NPXY	Dominio terminal de Clatrina, subunidad $\mu 2$ de AP-2, dominio PTB de Dab2	Internalización
YXXØ	subunidad μ del complejo AP	Internalización, distribución (targeting) lisosomal, y basolateral
[DE]XXXL[LI]	Subunidad μ y/o β del complejo AP	Internalización, distribución (targeting) lisosomal, y basolateral
DXXLL	Dominio VHS de las GGA _s	Localización (sorting) de TNG a endosomas
Grupo de aminoácidos ácidos	PACS-1	Localización (sorting) de endosomas a TNG
NPF(1,2)D	Dominio SHD1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S1a1p	Internalización
Ubiquitina	Dominios UIM, UBA, and UBC	Internalización, distribución (targeting) lisosomal/vacuolar

Los residuos de aminoácido: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina, I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, el methionine; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptofano, y Y, tirosina. X representa cualquier aminoácido y Ø un residuo de aminoácido voluminoso e hidrófobo.

Modificado de Bonifacino y Traub, 2003

8.2.2. Motivos del tipo dileucina

Los motivos del tipo dileucina están involucrados en la localización, la internalización y la distribución de numerosas proteínas a la membrana plasmática basolateral y lisosomal

[Bello, *et al.* 2001; Bonifacino y Traub, 2003; Stockklausner y Klöcker, 2003]. El motivo del tipo dileucina requiere dos leucinas consecutivas (LL) o un par leucina-isoleucina (LI) [Letourneur y Klausner, 1992; Sandoval y Bakke, 1994]. Aunque también los aminoácidos metionina y valina pueden ocupar la segunda posición en el motivo dileucina (LM y LV, respectivamente) [Sandoval *et al.*; 1994, Berg *et al.*; 1994, Tabuchi *et al.*; 2002]. Se han identificado dos distintas clases de motivos canónicos basados en dileucina representadas por las secuencias consenso [DE]XXXL[LI] y DXXLL. Proteínas como el receptor GLUT4, (del inglés Glucose Transporter type 4), tienen una señal de tipo [DE]XXXL[LI]; mientras que la señal DXXLL ha sido identificada en proteínas relacionadas con el receptor de LDL (del inglés LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor), [Bonifacino y Traub, 2003]. Los motivos dileucina de la forma [DE]XXXL[LI] son señales reconocidas por los complejos APs [Heilker, *et al.* 1996; Honing, *et al.* 1998; Le Borgne, *et al.* 1998; Peden, *et al.* 2001]. Durante la endocitosis mediada por clatrina, las proteínas en la superficie celular se seleccionan principalmente por el complejo AP-2 para su inclusión en vesículas recubiertas por clatrina [Mousavi, *et al.* 2004; Lodish, *et al.* 2004; Gong, *et al.* 2007; Royle, *et al.* 2005].

8.3. Tráfico de los canales GIRK

En los últimos años ha llegado a ser evidente que la actividad fisiológica de los canales GIRK no solo depende de los mecanismos de compuerta sino también de procesos de tráfico intracelular. Comparado a los abundantes estudios electrofisiológicos se conoce poco del tráfico intracelular de los canales GIRK. Ma *et al.* (2002) realizaron un análisis profundo de los patrones de distribución de los canales GIRK e identificaron secuencias de aminoácidos intrínsecas que controlan el tráfico intracelular de estos canales en la ruta biosintética así como entre los compartimentos endosomales y la membrana plasmática.

8.3.1. Motivos de Tráfico en los Canales GIRK

Varios grupos han reportado secuencias señal de tráfico específicos en los canales iónicos que son cruciales para su distribución y coensamble [Deutsch, C *et al.*, 2002]. Estudios en el tráfico de los canales Kir en diferentes sistemas de expresión heteróloga, reportan motivos que promueven la exportación de los canales desde el retículo endoplásmico, motivos que

promueven el reciclamiento a la superficie de los canales internalizados (Grupos ácidos), motivos de internalización y motivo de distribución lisosomal (**Tabla 5**) [Ma, *et al.* 2001, 2003]. Como ejemplo, los canales Kir1.1 y Kir2.1 contienen distintos motivos de tráfico que no son necesarios para el plegado, ensamble, o gating del canal, pero que son esenciales para la exportación de los canales desde el RE (**Tabla 5**) [Ma, *et al.* 2001, Stockklauser and Klöcker, 2003]. Por otra parte, los canales Kir1.1 y Kir2.3 presentan un motivo de internalización basado en tirosina [Zeng *et al.* 2002] y un motivo de di-isoleucina [Amanda K. Mason, 2008], respectivamente (**Tabla 5**); ambos canales son internalizados mediante vesículas recubiertas de clatrina. El canal Kir6.2 contiene un motivo que lo mantiene retenido en el RE [Zerangue *et al.*, 1999] y un motivo di-leucina (LL) que distribuye al canal hacia endosomas y/o lisosomas [Hu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2003a]. En la **tabla 5** se muestran los diversos motivos de tráfico de algunos canales Kir.

Tabla 5. Motivos de tráfico de canales de Potasio Rectificadores Entrantes

Canal	Motivo de distribución				
	Exportación desde el RE (N-terminal)	Clusters ácidos: reciclamiento de endosomas a membrana plasmática (C-terminal)	Internalización	Distribución lisosomal	Retención en RE
Kir1.1	^① <u>VLSEVDETD</u>		^⑤ YDNPWF (C-terminal)		
Kir2.1	^① <u>FCYENE</u>	^① EEEEEDSE			
Kir2.3			^② EEAGII (C-terminal)		
Kir3.2 (GIRK2)	^① <u>DQDVESPV</u>	^① <u>ELETEEEE</u>	^{①⑤} VL (N-terminal)		
Kir3.3 (GIRK3)				^① YWSI (C-terminal)	
Kir3.4 (GIRK4)	^① <u>NQDMEIGV</u>	^① <u>EAEKEAEAHEDEEEEPNG</u>			
Kir6.2/SUR1 (K _{ATP})			^④ LL (C-terminal)		^⑥ RKR (C-terminal)

^①Ma, *et al.* 2001 y 2002, ^②Mason *et al.* 2008, ^③Chung *et al.* 2008, ^④Hu *et al.*, 2003, ^⑤Zeng W *et al.*, 2002, ^⑥Zerangue *et al.* 1999

De igual manera, poco se sabe de los mecanismos moleculares que controlan el tráfico intracelular de los canales GIRK. El N-terminal y el C-terminal son las regiones en donde se presenta la mayor diferencia entre los miembros de la subfamilia GIRK (Kir3). Ma y

colaboradores (2002) identificaron que varios homotetrámeros y heterotetrámeros de los canales GIRKs presentan diferentes motivos para el tráfico que controlan su exportación desde el RE, su internalización desde la membrana plasmática, su distribución a la membrana plasmática a través de endosomas, y su distribución a lisosomas [Ma et al 2002]. Los canales homotetrámeros GIRK1 y GIRK3 residen exclusivamente en el retículo endoplásmico (RE), por el contrario, los homotetrámeros GIRK2A y GIRK4 se localizan en la membrana plasmática y unos pocos en vesículas (Figura B). Los canales GIRK2A y GIRK4 poseen dos motivos diferentes de tráfico que promueven la expresión de los homotetrámeros en la membrana plasmática (**Tabla 5; Figura 14**): un motivo de exportación desde el RE que se encuentra en la región de N-terminal y un motivo de reciclamiento (cluster ácido) situado en la región del C-terminal que dirige a los canales desde endosomas a la membrana plasmática (**Figura 14A**). Interesantemente el motivo de reciclamiento del canal GIRK2A es regulado por la fosforilación de un residuo de treonina 399 por casein cinasa II (**Tabla 5**). El nivel de expresión en la membrana plasmática del canal GIRK2 también es controlado por un motivo de internalización en el N-terminal similar al motivo de di-leucina LL (**Tabla 5; Figura 14A**). Los homotetrámeros GIRK1 están localizados en el RE, asociados con filamentos intermedios del citoesqueleto [Kennedy, et al 1996], mientras que los homotetrámeros GIRK4 y los heterotetrámeros GIRK1/GIRK4 se localizan en la superficie celular. Los homotetrámeros GIRK1 y GIRK3 no se expresan en la membrana plasmática debido a que carecen de un eficiente motivo de exportación desde el RE. Además, los canales GIRK3 tienen un motivo de distribución a lisosomas del tipo YXXØ (tabla; figura A), así los canales que llegan a salir del RE son eficientemente dirigidos a los lisosomas y rápidamente degradados [Kennedy et al 1996, Ma et al. 2002, Zylbergold, et al; 2010]. Ma et al (2002) demostraron que los canales heterotetrámeros GIRK1/GIRK2 y GIRK1/GIRK4 son dirigidos a la membrana plasmática, mientras que los heterotetrámeros GIRK1/GIRK3 están localizados en el RE (**Figura 14B**). La expresión en la membrana plasmática de heterotetrámeros GIRK1/GIRK2 y GIRK1/GIRK4 es regulada por los motivos de tráfico en GIRK2A y GIRK4; respectivamente, y promueven la salida del retículo y la expresión de GIRK1 en la superficie celular. Los canales GIRK4 son necesarios para la maduración y distribución a la superficie celular de los canales GIRK1 [Kennedy et al 1996, Ma, et al. 2002].

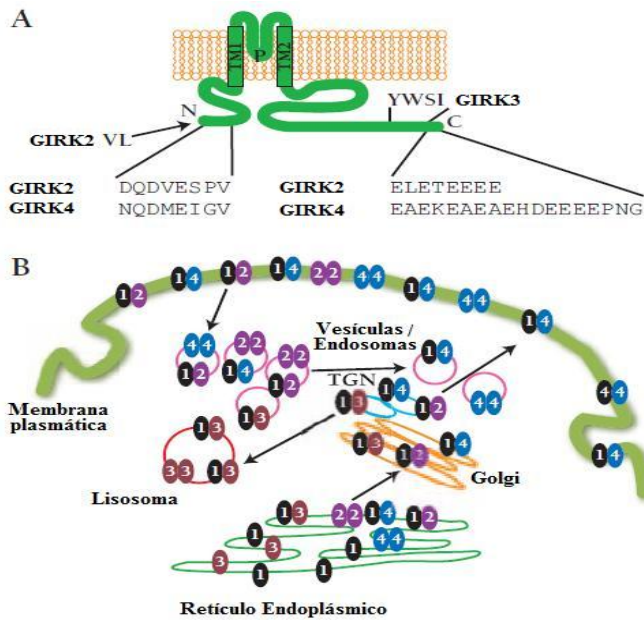


Figura 14. Tráfico de los canales GIRK. A) Diagrama que muestra la topología de los canales GIRK y la ubicación de los motivos de tráfico. B) Representación esquemática de la localización de las diferentes subunidades de canales (GIRK1–GIRK4; sólo se muestra la combinación de dos subunidades). Los canales y los compartimentos celulares están codificados por colores.[Modificado de Mirshahi y Logothetis, 2002.].

TM, transmembrana; P, region del Poro; TGN, la red trans -Golgi.

9. Antecedentes

9.1. El Canal GIRK5 en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Además del uso de los ovocitos de *Xenopus* en los estadios V y VI como sistema de expresión heteróloga, también han sido utilizados por muchas décadas para el estudio de la regulación del ciclo celular, biología del desarrollo y maduración [Rasar M. y Hammes S, Nebreda y Ferby; 2000]. Los ovocitos expresan de manera endógena al canal de potasio GIRK5. En los ovocitos la corriente basal es dependiente de una poza endógena de proteínas G $\beta\gamma$ libres que activan al canal GIRK5 endógeno. Se ha observado que la amplitud de la corriente endógena de 0.1 hasta cerca de 2 μ A y en algunos lotes de ovocitos es difícil detectarla (**Figura 15**) [Bauer, *et al.* 1996]. Esta corriente rectificadora entrante de los ovocitos presenta baja sensibilidad al bloqueo por Ba²⁺, Cs⁺ y 4-amino piridina [Bauer *et al.* 1996, Salvador *et al.* 2001 y 2003, Mora y Escobar 2005]. El canal GIRK5 se clonó a partir de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [Hedin *et al.* 1996]. Los canales GIRK5 presentan la región amino terminal más larga en comparación con sus homólogos de los mamíferos [Hedin, *et al.* 1996].

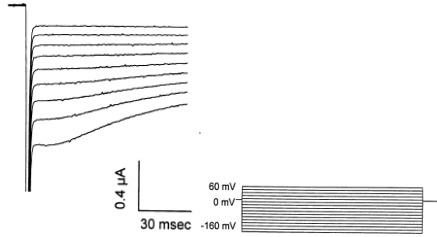
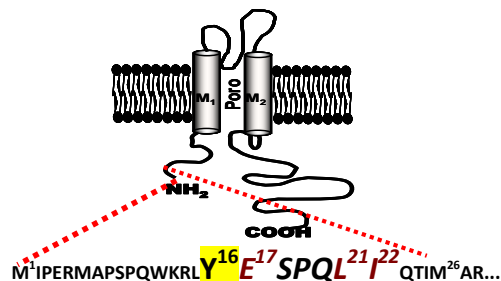


Figura 15. Corriente de K⁺ rectificadora entrante endógena registradas de los ovocitos de Xenopus. Solución de Registro con 118 mM de K⁺ [Modificada de Salvador, *et al.* 2001]

El canal mutante “GIRK5Y16A” fue funcional, se registró una corriente entrante del canal GIRK5 y del canal GIRK5Y16A de 0.68μA y 6.38 μA; respectivamente.

El gen del canal GIRK5 puede dar lugar a tres isoformas, GIRK5, Δ5GIRK5 y Δ25GIRK5 cuya diferencia radica principalmente en la longitud de la región amino terminal. Únicamente el canal Δ25GIRK5 forma homotetrámeros funcionales con una corriente entrante que sobrepasa los 5 μA a -160 mV en ovocitos de Xenopus y células de insecto [Salvador, *et al.* 2001 y 2003]. Las isoformas GIRK5 y Δ5GIRK5 no son funcionales porque no llegan a la membrana celular, ya que presentan una tirosina (Y16) en un sitio consenso de fosforilación en su extremo N-terminal (**Figura 16**). En el laboratorio se mutó la Y16 por la alanina (A).

Figura 16. Secuencia de los primeros 25 aminoácidos de del canal GIRK5. En rojo se muestra el motivo de endocitosis del tipo dileucina representada por la secuencia consenso [DE]XXX[LI]



Por otra parte, con los ovocitos inyectados con agua y con el ARN de los canales GIRK5 con la proteína de fusión verde fluorescente (del inglés EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein): EGFP-GIRK5 (quimera de la EGFP con el canal GIRK5 completo), EGFP-Δ25GIRK5 (quimera que contiene al canal sin los primeros 25 aminoácidos) y EGFP-Y16AGIRK5 (quimera que contiene la mutación puntual de la tirosina 16 por una alanina), e incubados con geldanamicina (75 nM), un inhibidor de cinasas de tirosinas, se concluyó que la fosforilación de la Y16 está implicada en la expresión funcional de los canales GIRK5 en la membrana plasmática (**Figura 17**). El residuo de tirosina (Y16),

localizado en la región del amino terminal, al ser fosforilado por la c-Src endógena mantiene al canal en un compartimento intracelular; y por tanto, regula el tráfico del canal GIRK5 a la membrana plasmática [Mora y Escobar, 2005].

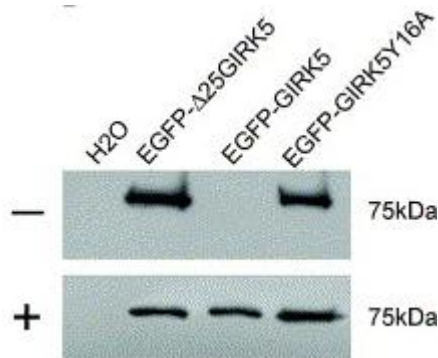


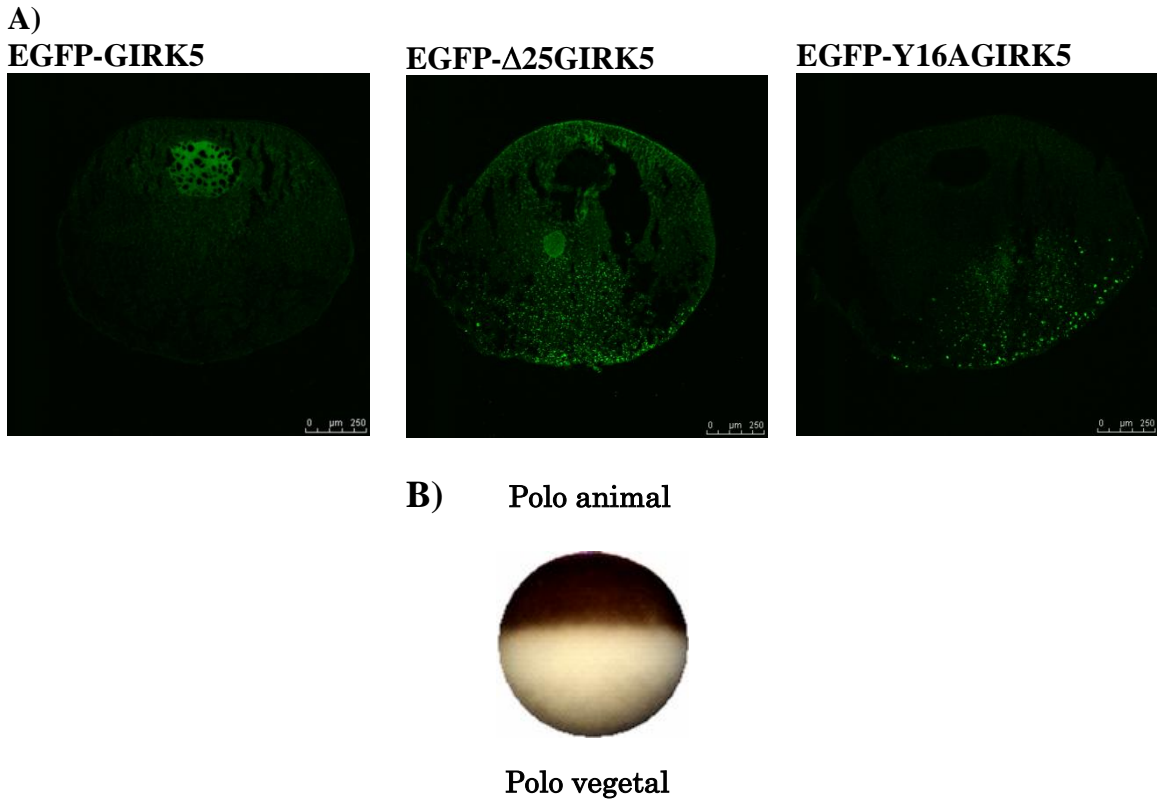
Figura 17. Geldanamicina promueve la expresión funcional de EGFP-GIRK5 en la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus*. Western blot de las proteínas de fusión GIRK5 en la fracción membranal. Los ovocitos incubados con (+) y sin (-) geldanamicina 75 nM. La banda de 75 kDa correspondiente a los canales EGFP-GIRK5Y16A y EGFP-Δ25GIRK5, se observó una banda del mismo peso en la línea correspondiente al canal EGFP-GIRK5. La banda de 75 kDa se identificó con el anticuerpo monoclonal anti EGFP de ratón. [Mora y Escobar, 2005]

El canal GIRK5 presenta una señal del tipo dileucina representada por la secuencia consenso **ESPQLI** en la región del N-terminal (**Figura 16**) la cual está acotada por la tirosina fosforilable (Y16). En el **figura 18**, se observa que la expresión de las proteínas quiméricas permitió comprobar por microscopía confocal que existe una diversa distribución de las proteínas dependiendo de su secuencia en los ovocitos de *Xenopus laevis*. En A) se observó que la quimera con Δ25GIRK5 se encontró con una distribución uniforme sobre toda la superficie del ovocito, la quimera GIRK5 se mantiene retenida en una estructura subcelular; y mientras que la quimera EGFP-Y16AGIRK5 se encuentra en membrana plasmática y en vesículas intracelulares (datos no publicados; tesis de Doctorado de Beatriz Díaz Bello). En todas las figuras, en cada corte de los ovocitos con las muestras EGFP-Δ25GIRK5, EGFP-GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5 se muestra las diferencias de la distribución de las proteínas (**Tabla 4, Figura 18A**). En la recepción de imágenes en el microscopio confocal, la orientación del ovocito resulta con el polo animal en la parte superior y el polo vegetal en la parte inferior (**Tabla 4, Figura 18B**).

9.2. Motivo de dileucina en el canal GIRK5.

GIRK5 presenta una región amino terminal más larga por 25 aminoácidos en comparación con sus homólogos de mamífero y forma homomultímeros funcionales ya que el canal GIRK5 endógeno puede registrarse en soluciones con alto K^+ a voltajes hiperpolarizantes y es de magnitud variable (0.1 hasta cerca de 1 μA) dependiendo del lote de ovocitos.

Figura 18. Distribución diferente de los canales recombinantes GIRK5. A) Imágenes de microscopía confocal para EGFP-GIRK5, EGFP- Δ 25GIRK5 y EGFP-Y16AGIRK5. Día 5 de expresión, la barra inferior equivale a 250 μ m. B) Orientación del ovocito de la rana *X. laevis*.



En esta región del N-terminal, el canal GIRK5 presenta un motivo de internalización del tipo dileucina representada por la secuencia consenso ESPQLI (Tabla 4, Figura 16) la cual está acotada por la tirosina fosforilable (Y16). Al parecer es el motivo mediante el cual puede ser regulado el tráfico intracelular del canal GIRK5 y por tanto, alterar así su densidad y función en membrana plasmática del ovocito de *Xenopus laevis*. El motivo del tipo dileucina está involucrado en la internalización, distribución a lisosomas así como a la distribución a la membrana plasmática basolateral de numerosos receptores, canales iónicos y transportadores [Bello, *et al.* 2001; Bonifacino y Traub, 2003; Stockklausner y Klöcker, 2003]. EL motivo del tipo dileucina requiere dos leucinas consecutivas (LL) o un par leucina-isoleucina (LI) [Letourneur y Klausner, 1992; Sandoval y Bakke, 1994].

10. Planteamiento del Problema

Los canales GIRK5 se expresan endógenamente en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* y sus corrientes generalmente son menores de 1 μ A. Hasta el momento, se dispone de poca información acerca del papel fisiológico del canal GIRK5 en los ovocitos. La fosforilación de la Y16 en el canal GIRK5 [Mora y Escobar, 2005] puede ser un indicador de un mecanismo regulador de los niveles de expresión del canal GIRK5 en la membrana plasmática y, de esta manera, puedan contribuir a mantener a los ovocitos arrestados en la fase G2 de la meiosis I del ciclo celular.

El número de canales en la membrana plasmática es fundamental para funciones fisiológicas celulares. Por lo tanto, la poca expresión funcional de los canales GIRK5 en la membrana, sugiere una regulación del tráfico intracelular del canal para modular su cantidad y composición de los canales en la membrana, lo que sería de particular importancia para el funcionamiento celular [Mikosch, et al. 2006 y 2009]. Estudios recientes sugieren que el tráfico intracelular de los canales GIRKs de mamíferos se regula por motivos de tráfico intrínsecos [Ma, et al. 2002]. La tirosina 16 (Y16) está adyacente a un motivo de dileucina representado por las secuencias consenso **EXXXLI**. Estos motivos funcionan como señales en la distribución a la membrana plasmática basolateral, a lisosomas e internalización de numerosas proteínas [Bonifacino y Traub, 2003]. La presencia del motivo EXXXLI amplía la posibilidad de que esta secuencia consenso pueda ser requerida para la expresión de los canales GIRK5 funcionales en la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus laevis*. Se propone que la expresión funcional del canal GIRK5 en la membrana plasmática además de ser regulada por la fosforilación de la tirosina (Y16) por una PKT tipo Src [Mora y Escobar, 2005], también puede ser modulada por el motivo de internalización “**ESPQLI**”. Es por ello que resulta importante identificar si la secuencia consenso “ESPQLI” corresponde al motivo de dileucina “[**D/E**] **XXXL** [**L/I**]”. Se sabe que la sustitución del residuo ácido y de cualquiera de las leucinas por alanina (A) anula todas las actividades del motivo [D/E]XXXL[L/I] [Bonifacino y Traub, 2003]. Para especificar que residuos de aminoácidos son cruciales en la secuencia consenso **ESPQLI** del N-terminal del canal GIRK5, los residuos: glutamato (E17), serina (S18), prolina (P19), glutamina (Q20), leucina (L21) e isoleucina (I22) en la secuencia ESPQLI, se mutaron uno a uno al aminoácido hidrofóbico de alanina (A). Hasta la fecha no se ha

reportado que estos motivos estén acotados por residuos de tirosina fosforilable “Y16EXXXLI”, por ello, la mutación de la Y16 a alanina (A) fue incluida en el análisis. Mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltaje clamp) se determinó la expresión funcional de los canales GIRK5 mutantes en la membrana plasmática.

11. Hipótesis

- 1) La secuencia consenso **ESPQLI** en el N-terminal de los canales GIRK5 representa un motivo de internalización del tipo dileucina “[D/E]XXXL[L/I].
- 2) Si la señal E17XXXL21I22 en el N-terminal de los canales GIRK5 es del tipo dileucina, entonces **mutaciones** dobles y triples en los **residuos** L21/I22 y E17/L21/I22; respectivamente en la secuencia ESPQLI resultará en la ausencia del motivo, lo que causará la expresión funcional de los canales GIRK5 mutantes.
- 3) **Si** la secuencia consenso **ESPQLI** en el N-terminal de los canales GIRK5 representa un motivo de distribución del tipo dileucina, entonces al mutar individualmente los residuos de serina (S), prolina (P) y glutamina (Q) del amino terminal del canal GIRK5 a alanina (A), los canales mutantes **no** serán funcionales. Por el contrario, si se mutan individualmente los residuos de aminoácidos cruciales en la secuencia consenso: el glutamato (E), la leucina (L) e isoleucina (I); los canales GIRK5 mutantes serán funcionales resultando en un aumento en el número de canales en la membrana plasmática, lo que daría lugar a un incremento proporcional en la amplitud de la corriente entrante de K^+ .
- 4) La mutación adicional de la Y16 localizada río abajo del motivo Y16EXXXLI a alanina (A), resultará en un gran aumento en la cantidad de canales mutantes GIRK5 funcionales en comparación a los canales GIRK5 mutantes que no presentan esta mutación, ya que la fosforilación de tirosina 16 (Y16) los mantendrá retenidos intracelularmente en los ovocitos de *Xenopus laevis*.

12. Objetivos

12.1. Objetivo General

- 1) Analizar el efecto de la mutación por alanina (A) de cada aminoácido de la secuencia consenso ESPQLI identificada en el N-terminal del canal GIRK5 (GIRK5E17A, GIRK5S18A, GIRK5P19A, GIRK5Q20A, GIRK5L21A, GIRK5I22A, GIRK5L21AI22A y GIRK5E17A L21AI22A) e investigar el efecto de las mutaciones en las corrientes del canal GIRK5.

12.1.2. Objetivos particulares

- ✓ Producir los canales mutantes GIRK5 por mutagénesis dirigida del canal GIRK5 en los residuos Glutamato17, Leucina 21 y en Isoleucina 22 por Alanina; e Isoleucina22 por Leucina.

Analizar el efecto de la mutación por alanina (A) de dos, tres y cuatro aminoácidos de la secuencia consenso ESPQLI identificada en el N-terminal del canal GIRK5, más la mutación de la tirosina (Y16) localizada río arriba del motivo en las corrientes del canal GIRK5.

Estudiar si las mutantes del canal de potasio GIRK5: E17A L21AI22A, L21AI22A, Y16AE17AL21AI22A, Y16AL21AI22A, Y16AI22A son funcionales.

- ✓ **Obtención *in vitro*** del mRNA de los canales mutantes GIRK5
- ✓ Expresar los canales mutantes GIRK5 en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*
- ✓ Expresar los canales mutantes GIRK5Y16AE17A L21AI22A, GIRK5Y16AL21AI22A en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*
- ✓ Registrar las corrientes entrantes de K⁺ de los canales mutantes GIRK5 en los ovocitos por la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos.

13. Materiales y Métodos

13.1. Biología Molecular

13.1.1. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR para obtener los canales mutantes del GIRK5:

- **GIRK5E17A**
- **GIRK5S18A**
- **GIRK5P19A**
- **GIRK5Q20A**
- **GIRK5L21A**
- **GIRK5I22A**
- **GIRK5L21AI22A**
- **GIRK5E17AL21AI22A**
- **GIRK5Y16AI22A**
- **GIRK5I22L**

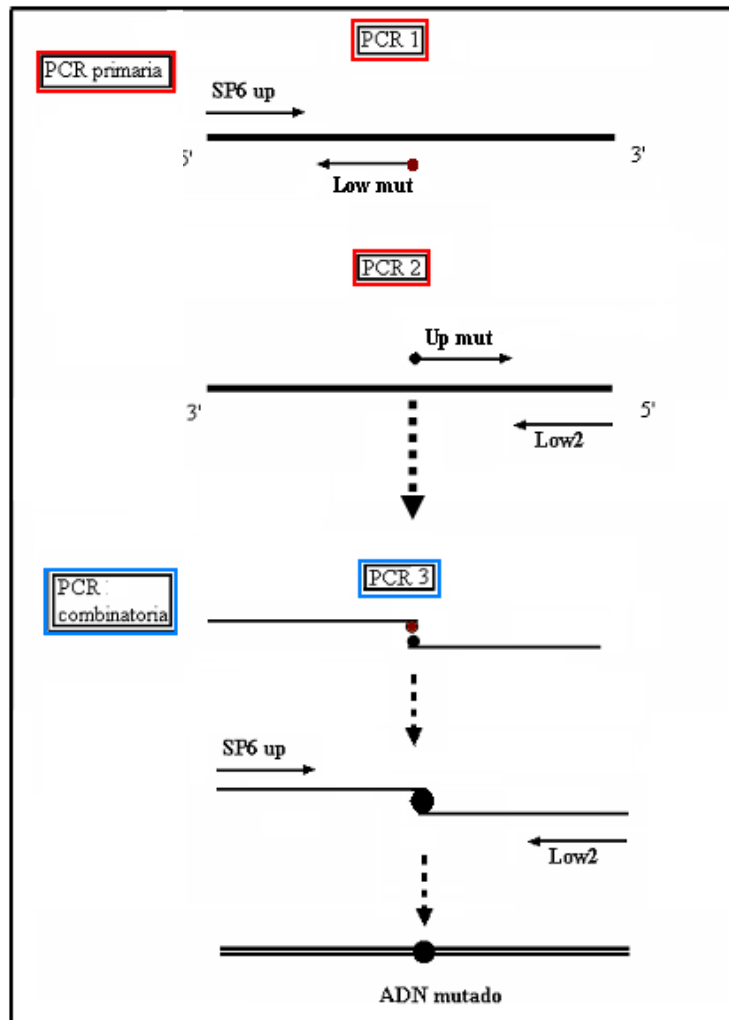
Las mutaciones puntuales de la E17, S18, P19, Q20, L21 e I22 por alanina (**E17A, S18A, P19A, Q20A, L21A e I22A, L21A/I22A**) y la mutación de I22 por leucina (**I22L**), en los canales GIRK5; la doble mutación en Y16/I22 por alanina (**Y16A/I22A**), en los canales GIRK5I22A; y la triple mutación en E17/L21/I22 por alanina (**E17A/L21A/I22A**), en los canales GIRK5L21A/I22A, se realizaron mediante la técnica de mutagénesis dirigida por la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés PCR: Polimerase Chain Reaction; Erlich 1992; Weiner *et al* 1995; Zhu 19925 y 1997). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los iniciadores de 21 a 31 pares de bases diseñados para cada uno de los residuos a mutar: E17A, S18A, P19A, Q20A, L21A, I22A, L21A/I22A, Y16A e I22L (5' y 3' [up (sentido) y low (antisentido)]). Se utilizaron los primers SP6 (sentido) y Low2 (antisentido) como iniciadores de los extremos (ver apéndice A2). En el **Figura 19** se muestra la estrategia a seguir para obtener los canales mutados. Inicialmente se realizaron dos amplificaciones del ADN (PCR primaria) con los diferentes iniciadores para obtener dos fragmentos entre 18 y 32 pares de bases idénticas incluyendo la mutación deseada (**Figura 19, PCR 1 y PCR 2**).

En la primera amplificación (**PCR 1**) se utilizó el iniciador 5' SP6 (sentido) y el iniciador 3' mutado (E17A_{low} ó S18A_{low} ó P19A_{low} ó Q20A_{low} ó L21A_{low} e I22A_{low}, Y16A_{low}, L21A/I22A_{low}, I22L_{low}). En la segunda amplificación (**PCR 2**) se utilizó el iniciador 5' mutado (E17A_{up} ó S18A_{up} ó P19A_{up} ó Q20A_{up} ó L21A_{up} I22A_{up}, Y16A_{up}, L21A/I22A_{up}, I22_{up}) y el iniciador 3' low2 (antisentido). Los fragmentos obtenidos se purifican a partir de geles de agarosa al 1%. En una tercera amplificación (**PCR3**

combinatoria) se emplearon como templado de ADN los fragmentos obtenidos en la PCR 1 y PCR 2 para cada canal mutante.

En esta amplificación los iniciadores a los extremos utilizados fueron el “5’ SP6 (sentido) y el 3’ low2 (antisentido)” (**Figura 19**, PCR3 combinatoria). Los fragmentos se recombinaron en sus bases que comparten y se amplificaron con los iniciadores a los extremos. El proceso y las condiciones de esta reacción se muestran en el apéndice.

Figura 19. Estrategia a seguir para obtener los fragmentos mutados “S18A, P19A y Q20A”. En la PCR primaria (PCR1 y PCR2) se generan los fragmentos mutados que sirven de templado para la PCR 3 combinatoria.



13.1.2. Ligación al vector PBF

Para la ligación del DNA obtenido del canal mutado (E17A ó S18A ó P19A ó Q20A ó L21A ó I22L ó I22A ó L21A/I22A ó Y16A/I22A ó E17/AL21A/I22A) y el vector para ovocitos PBF se cortaron con la endonucleasa de restricción NcoI para generar los mismos extremos cohesivos. El vector se incubó con la enzima fosfatasa alcalina para evitar la re-

circularización del mismo. Ambas digestiones correspondientes al fragmento mutado y al vector se purifican a partir de geles de agarosa al 1% y posteriormente se colocan en una reacción de ligación, la reacción se catalizó con la enzima T4 ligasa (**Figura 20**, ver apéndice A1).

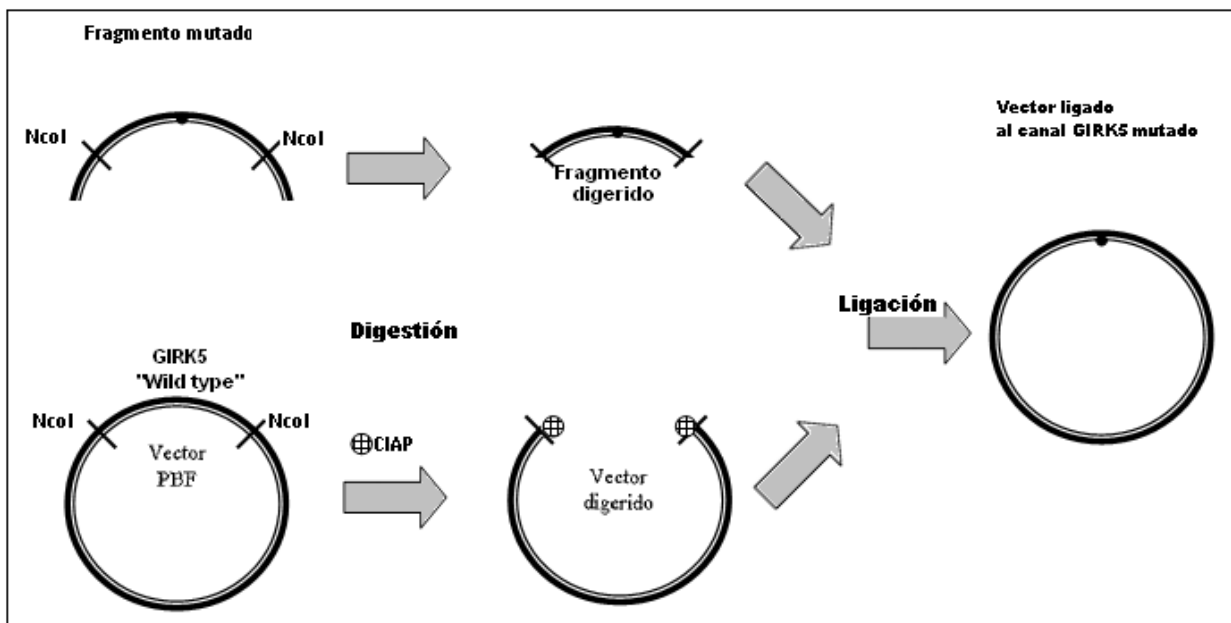


Figura 20. Estrategia de ligación del fragmento mutado al vector PBF.

13.1.3. Transformación.

Se prepararon células competentes de una cepa de *E. coli* (DH5 α ; ver apéndice A1) y se transformaron con el DNA inserto en el vector PBF obtenido de la ligación anterior (incluidos los controles, ver apéndice A1). La transformación se realizó con el método de choque térmico utilizando medio LB, como control negativo se utilizó una muestra de células sin transformar y como control positivo el canal GIRK5. Las bacterias que se transforman correctamente con el plásmido presentan resistencia a ampicilina. Las muestras transformadas se sembraron en placas de agar LB con ampicilina. Se incubaron entre 12-14 horas a 37 °C

13.1.4. Obtención del DNA.

De las colonias que crecieron en las cajas de LB con ampicilina se seleccionaron 3 UFC aisladas y se sembraron en 5mL de medio LB con ampicilina durante 16-18hrs a 37°C. El

DNA se obtuvo por lisis alcalina (minipreparación; Sambrook, et al, 1989). Se realizan ensayos con enzimas de restricción para comprobar la dirección de 5' a 3' del DNA de cada canal mutante ligado al vector. Una vez que se comprobó que los tamaños del DNA cortados corresponden a los pesos esperados se realizó una midipreparación utilizando el kit Max Prep (Quiagen). El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260nm.

13.1.5. Secuenciación.

Los ADNs de cada mutante se secuenciaron con la técnica automatizada de electroforesis capilar con el equipo AB1 Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

13.1.6. Transcripción *in vitro*.

El ARNm complementario (ARNc) se sintetizó con el kit mMessage mMachine (Ambion Corporation, Austin, TX) siguiendo las especificaciones del proveedor. El ARNc de todas las variantes del canal GIRK5 se sintetizaron con la enzima SP6 ARN polimerasa. Nota: Los diferentes ADNc y ARNc se analizaron en geles de agarosa al 1%(ver apéndice A1). La concentración de los ácidos nucleicos en solución se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

13.2. Obtención y manejo de los ovocitos.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* de los estadios V-VI se obtuvieron por ovariectomía parcial. Los ovocitos se desfolicularon mediante una digestión enzimática con colagenasa tipo 1A (2 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) disuelta en medio ND96 libre de calcio (mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, pH 7.4) por 1 hora a una temperatura de 21-23°C. Los ovocitos se mantuvieron a 18°C en medio ND96 (mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 piruvato, 0.05 mg/ml de gentamicina, pH 7.4).

13.3. Microinyección del RNA en los ovocitos.

Los ovocitos se inyectaron con 50 nl de ARNc (25 ng por ovocito). Los ovocitos inyectados con 50 nl de agua se utilizaron como control.

13.4. Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en los ovocitos.

A partir de dos a cuatro días después de la inyección, los ovocitos se registraron con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (voltage clamp). Se utilizó un convertidor analógico digital (DIGIDATA 1322A), un amplificador (Geneclamp 500B), el software (pClamp 8.0) todos de Axon Instruments Inc. Foster City, CA, y una PC pentium III (Intel) para la adquisición de los registros. Las corrientes totales se obtuvieron a partir de la aplicación de un protocolo de 12 pulsos, cada uno con una duración de 100 ms a un potencial de mantenimiento de 0 mV. Los pasos de voltaje aplicados fueron desde -160 a +60 mV. Los ovocitos se registraron con dos microelectrodos con resistencias de 0.5 a 2 M Ω . Las pipetas de registro se llenaron con una solución 3 M de KCl. Una solución alta en potasio se utilizó como medio de registro (mM: 118 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4). La adquisición de los datos y el análisis de los registros se realizaron con el software pClamp 8.0.

13.5. Análisis estadístico

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

14. Resultados

14.1. Biología Molecular

14.1.1. Mutagénesis dirigida y recombinación por PCR

Se amplificó el cDNA de los canales mutantes: GIRK5E17A, GIRK5S18A, GIRK5P19A, GIRK5Q20A, GIRK5L21A, GIRK5I22A, GIRK5L21A/I22A, GIRK5E17A/L21A/I22A, GIRK5Y16A/I22A y GIRK5I22L. A continuación sólo se muestra la mutagénesis dirigida y recombinación por PCR para obtener los canales mutantes GIRK5E17A/L21A/I22A y GIRK5Y16A/I22A.

14.1.2. Obtención de los fragmentos mutados: E17A/L21A/I22A e Y16A/I22A.

14.1.2.1. El proceso y las condiciones de la reacción de PCR se muestran en el apéndice A1.

PCR Primaria (PCR1 y PCR2): En la **figura 21** se muestra el gel con la amplificación de los fragmentos mutados para las mutantes E17A/L21A/I22A y la mutante Y16A/I22A, respectivamente. Las bandas de 184pb y 182pb corresponden a la PCR1 y las bandas de 766pb y 769pb corresponden a la PCR2. Cada reacción de PCR se realizó cinco veces. Los fragmentos obtenidos para cada una de las mutantes se purificaron a partir de los geles de agarosa (**Figura 21**).

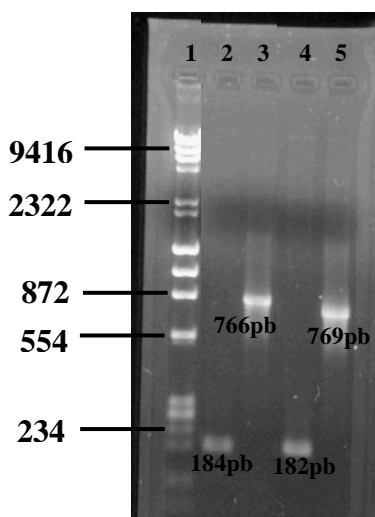


Figura 21. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los fragmentos obtenidos por la PCR primaria (PCR1 y PCR2). En la línea 1 se aprecia el marcador de peso en pares de bases (pb). En la segunda y tercer línea se observan los fragmentos mutados para la mutante E17A/L21A/I22A, las bandas de 184pb y 766pb corresponden a la PCR1 y PCR2, respectivamente. En la línea 4 y 5 se observan los fragmentos mutados para la mutante Y16A/I22A, las bandas 182pb y 769pb corresponden a la PCR1 y PCR2, respectivamente.

14.1.2.2. PCR combinatoria (PCR3): se realizó una tercera amplificación donde se emplearon los fragmentos obtenidos en la PCR 1 y PCR 2 como molde de ADN para cada

canal mutante. En la **figura 22** se observan los fragmentos de 932pb para cada una de las mutantes. Cada reacción de PCR se realizó cinco veces.

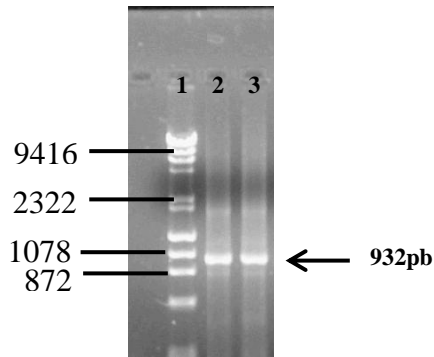


Figura 22. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los fragmentos obtenidos por la PCR combinatoria (PCR3). Fragmentos de 932pb para cada mutante: línea 2 mutante E17A/L21A/I22A y línea 3 mutante Y16A/I22A. La línea 1 es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Los fragmentos obtenidos para cada una de las mutantes se purificaron a partir de los geles de agarosa al 1% (**Figura 23**).

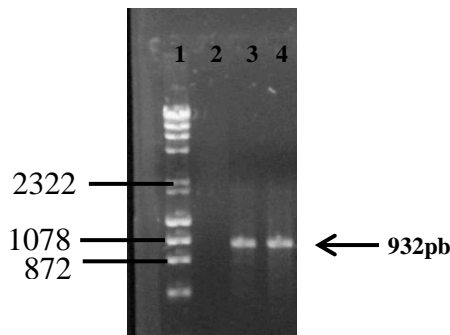


Figura 23. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los fragmentos mutados purificados de la PCR3. En la línea 1 se aprecia el marcador de peso molecular en pares de bases (pb). En las líneas 3 y 4 se observan los fragmentos mutados purificados de 932 pb para las mutantes E17A/L21A/I22A e Y16A/I22A; respectivamente.

14.2. Ligación al vector PBF

Una vez obtenidos y purificados los fragmentos de cDNA mutados Y16A/I22A y E17/AL21A/I22A de 932pb (**Figura 23**), se ligaron al vector para ovocitos PBF mediante la generación y ligación de los extremos cohesivos con la endonucleasa de restricción NcoI (**Figura 20**, ver metodología). Las bandas de 255pb corresponde a los fragmentos del DNA mutado (**Figura 24**, líneas 3, 4) y la banda de 2727pb pertenece al vector PBF (**Figura 24**, línea 5).

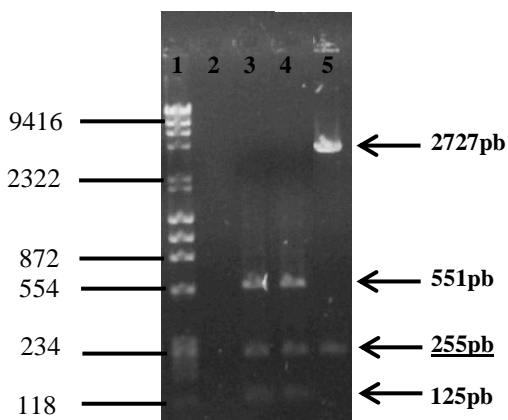


Figura 24. Gel de agarosa 1%, se muestran el análisis de restricción con la enzima NcoI. En la línea 1 se aprecia el marcador de peso molecular en pares de bases (pb). En las líneas 3 y 4 se observan los fragmentos digeridos de DNA mutado E17A/L21A/I22A, e Y16A/I22A; respectivamente. En la línea 5 se muestra la digestión del vector PBF.

Los fragmentos digeridos se purificaron e incubaron en la reacción de ligación (**Figura 25**, ver apéndice A1). Las células competentes DH5 α se transformaron con el DNA inserto en el vector PBF obtenido de las reacciones de ligación (ver metodología y Apéndice A1).

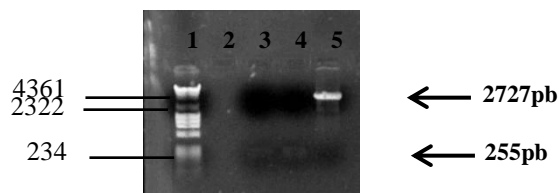


Figura 25. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los fragmentos de DNA mutantes y del Vector PBF purificados. Las líneas 3 y 4 muestran los fragmentos de 255pb para cada mutante: E17A/L21A/I22A e Y16A/I22A. El fragmento de 2727 corresponde al Vector PBF (línea 5). La línea 1 es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

14.3. Obtención del cDNA.

De las UFC que incorporaron el fragmento mutante ligado al vector PBF se obtuvo por lisis alcalina el cDNA para las mutantes Y16A/I22A y E17/AL21A/I22A (minipreparación, ver Apéndice A1). Para comprobar la dirección de 5' a 3' del DNA clonado de cada canal mutante, se efectuó un análisis de restricción enzimática. La **Figura 26a** y **26b** muestran las bandas con los pesos esperados del DNA (1214pb y 2989pb) después de los cortes con las enzimas de restricción Sal-I y Pst-I. En la **Figura 26a** se muestra la digestión enzimática correspondiente al DNA mutante E17/AL21A/I22A (líneas 4, 5 y 6) y al DNA mutante Y16A/I22A (líneas 7, 8 y 10). En la **Figura 26b** las líneas 2, 3 y 4 corresponden al DNA mutante E17/AL21A/I22A; y las líneas 5, 6 y 7 al DNA mutante Y16A/I22A.

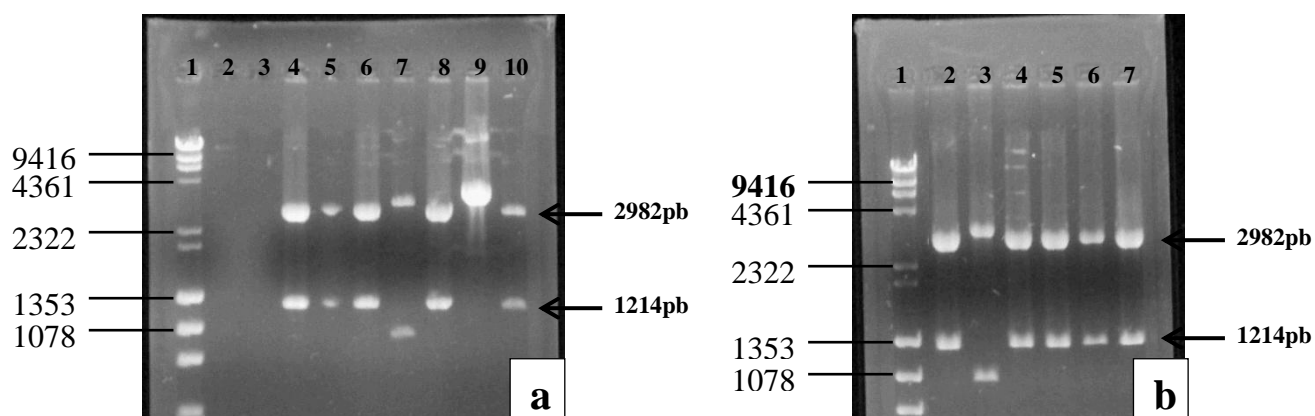


Figura 26. Gel de agarosa al 1% donde se presentan la digestión enzimática de restricción con las endonucleasas Sal-I y Pst-I. a) líneas 4, 5 y 6: E17A/L21A/I22A, líneas 7, 8 y 10: Y16A/I22A. b) líneas 2, 3 y 4: E17A/L21A/I22A, líneas 5, 6 y 7: Y16A/I22A. a) y b) línea 1: Marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

De estos resultados se seleccionaron 2 muestras de cDNA mutante de las minipreparaciones, (**Figura 26a**, línea 6 y **Figura 26b**, línea 6) y se les hicieron otras pruebas de digestión. En la **Figura 27** se presenta el análisis de restricción enzimática con las enzimas Sal-I (líneas 2, 3) y BamH-I (líneas 4, 5), donde se observan las bandas de los tamaños esperados (4196pb).

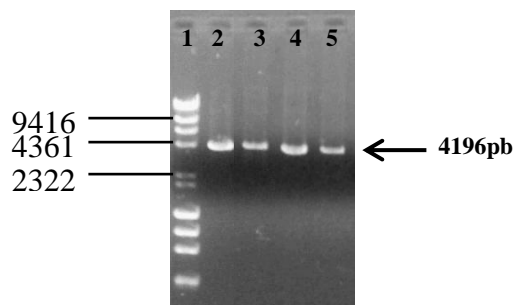


Figura 27. Gel de agarosa 1% donde se presentan la digestión enzimática con las endonucleasas Sal-I (líneas 2, 3) y BamH-I (la líneas 4, 5). Fragmentos de 4196 pb para cada mutante: E17A/L21A/I22A (líneas 2 y 4) e Y16A/I22A (líneas 3 y 5) en la línea 1 se muestra al marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

De las muestras seleccionadas del cDNA mutante se comprobó que los tamaños del DNA cortados correspondieran a los pesos esperados, por lo que se realizó una midipreparación utilizando el kit Max Prep (Quiagen). El cDNA purificado se cuantificó por espectrofotometría UV con una longitud de onda de 260nm.

14.4. Secuenciación.

Las muestras de cDNA purificado de cada mutante se secuenciaron automáticamente con la finalidad de corroborar si efectivamente estaba presente la mutación esperada. En la **Figura 28** y **Figura 29** se representa una de las regiones secuenciadas de las mutantes Y16A/I22A y E17/AL21A/I22A, respectivamente. En letras subrayadas se resalta el codón mutado y en negritas se muestra el codón que representa el canal silvestre.

14.5. Transcripción *in vitro*

Para linearizar el vector que contiene el cDNA mutante purificado obtenido de la midipreparación se digirió con la enzima Mlu-I (**Figura 30**).

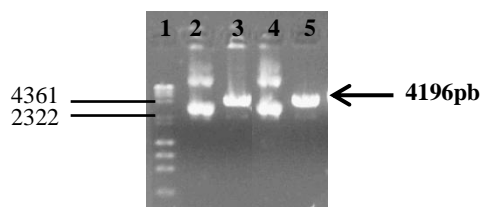


Figura 30. Gel de agarosa 1% donde se presentan la digestión enzimática con la endonucleasa Mlu-I. En la línea 1 el marcador de peso molecular en pares de bases (pb). EL cDNA de la mutante: E17A/L21A/I22A se observa en las líneas 2 y 3, en las líneas 4 y 5 en cDNA Y16A/I22A. las líneas 3 y 5 muestran los fragmentos de cDNA linearizado con la enzima de restricción Mlu-I. Las líneas 2 y 4 muestran el cDNA sin digerir.

Una vez linearizado el cDNA se realizó la transcripción *in vitro* (**Figura 31**). El tamaño esperado es de 2348pb. Esta reacción fue catalizada con la enzima Sp6 RNA polimerasa. La concentración del RNA se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

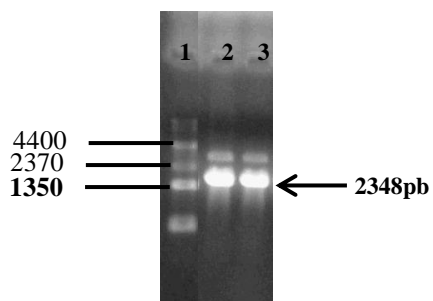


Figura 31. Gel de agarosa 1% con el RNA de los canales GIRK5 mutantes. Marcador de peso molecular RNA en pares de bases (pb) se muestra en la línea 1. RNA del canal mutante GIRK5E17A/L21A/I22A en la línea 2. RNA del canal mutante GIRK5Y16A/I22A en la línea 3.

14.6. Registros electrofisiológicos

14.6.1. Expresión de los canales mutantes en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

El sistema de expresión empleado fueron los mismos ovocitos de la rana *Xenopus laevis* ya que la corriente endógena de GIRK5 nunca rebasa los 0.8 μ A cuando llega a registrarse. Por otra parte, en un trabajo previo del laboratorio se demostró que los canales truncados Δ 25GIRK5 también son funcionales en células de insecto [Salvador, *et al.* 2003]. En consecuencia, y por nuestro interés en caracterizar el papel fisiológico de estos canales en el ovocito, éstos se utilizaron en el estudio de los canales GIRK5 recombinantes. La actividad de los canales iónicos expresados en los ovocitos puede determinarse por técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (Voltage Clamp). La técnica permite registrar las corrientes macroscópicas de centenares de canales [Aidley y Stanfield, 1998].

14.6.2. Registros electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Se investigó el papel de la secuencia consenso ESPQLI del canal GIRK5 como un motivo de dileucina. Los resultados electrofisiológicos proporcionan información de la densidad de canales activos en la membrana plasmática y; en consecuencia, nos ayuda a determinar si el motivo afecta la densidad de los canales en la membrana del ovocito [Zuzuarte, *et al.* 2009; Mikosch, *et al.* 2009]. El protocolo de voltaje para registrar el curso temporal de las corrientes iónicas consistió de 12 pulsos que fueron en 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 32**).

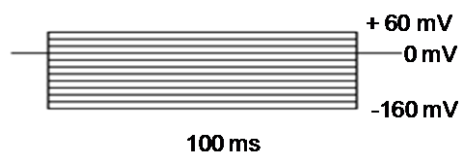


Figura 32. Protocolo de pulsos de voltaje utilizado.

Una solución alta en K^+ (118 mM) se utilizó como medio de. De esta manera, en potenciales de membrana hiperpolarizantes se facilitó el flujo entrante de K^+ por un gradiente eléctrico a través de los canales Kir. Cuando la concentración de K^+ en ambos lados de la membrana es igual, los canales de K^+ rectificadores entrantes permiten el

movimiento de los iones K^+ hacia el interior de la célula a valores de potencial de membrana más negativos que el E_k [Kubo, *et al.* 1993; Nichols and Lopatin, 1997].

La desventaja de registrar corrientes macroscópicas ocurre cuando diferentes tipos de canales iónicos contribuyen a la magnitud de la corriente registrada. La eliminación de las corrientes no deseadas se realiza mediante la aplicación de bloqueadores selectivos o por selección de un intervalo de voltaje en el que sólo un tipo de canal es activado [Standen y Stanfield, 1992].

En este trabajo, el potencial de mantenimiento se fijó en 0 mV para inactivar muchos de los canales iónicos activados por voltaje endógenos del ovocito [Salvador *et al.* 2001].

La corriente endógena de cloro dependiente de Ca^{2+} se activa a potenciales de membrana entre +40 mV a +100 mV en una solución Ringer [Martínez, *et al.* 1999; Machaca y Hazell, 1998]. Para prevenir la activación de los canales de cloro dependientes de Ca^{2+} (ICl- Ca) en una solución alta en K^+ (KCl 118 mM) no se aplicaron potenciales más despolarizantes de +60 mV.

Por otra parte, los canales de cloro activados por hiperpolarización están activos en potenciales de membrana entre -80 mV a -140 mV. En una solución de registro “Ringer” las corrientes de cloro alcanzan un nivel de corriente de 0.24 μA [Kowdley, *et al.* 1994]. Bauer y colaboradores (1996) determinaron que aunque los canales de Cl^- están activos durante el registro de las corrientes del canal GIRK5 endógeno en los ovocitos, el Cl^- no tiene ningún efecto sobre la amplitud de la corriente entrante de K^+ al registrarla en una solución KCl 118 mM y una solución de gluconato de K^+ 118 mM [Bauer *et al.* 1996].

Una propiedad farmacológica de los canales Kir es la alta sensibilidad al bloqueo de la corriente por Ba^{2+} externo. En un trabajo previo se comprobó que el canal truncado $\Delta 25GIRK5$ es más sensible al bloqueo por Ba^{2+} externo que el heterotetramero GIRK1/GIRK4. La EC_{50} fue de 170 μM en el rango de voltaje de -160 a -80 mV, lo que indicó que el bloqueo por Ba^{2+} externo es independiente del voltaje [Salvador *et al.* 2001]. Mora y Escobar confirmaron que no existe diferencia en la afinidad al bloqueo por Ba^{2+} externo entre los canales truncado $\Delta 25GIRK5$ y los canales recombinantes GIRK5Y16A. La EC_{50} para el canal GIRK5Y16A es de 173 μM ; y el bloqueo por Ba^{2+} externo no depende del voltaje [Mora y Escobar, 2005]. De esta manera se infiere que los canales GIRK5 mutantes presentarán el mismo comportamiento del bloqueo por Ba^{2+} extracelular.

14.6.3. Relación corriente-tiempo

En las condiciones experimentales mencionadas se registró el curso temporal de las corrientes rectificadoras entrantes de los canales GIRK5 mutantes. Los registros de la **Figura 34a** muestran un ejemplo representativo del curso temporal o de la relación corriente vs tiempo. En los registros de los ovocitos inyectados con cRNA de los canales mutantes se pueden apreciar los trazos de la corriente rectificadora entrante que se originó desde el potencial de mantenimiento (0 mV) como respuesta a una serie de pulsos de voltaje. El potencial de mantenimiento tiene el valor del potencial de equilibrio del ión K^+ (E_K).

14.6.4. Relación corriente – voltaje (I-V)

La **Figura 34b** es un ejemplo de la relación corriente – voltaje, para ello se graficó la corriente como una función del voltaje, con la corriente en las ordenadas y el voltaje en las abscisas. Para crear la curva I-V se utilizaron las corrientes registradas a los 10 ms de iniciados los pulsos de voltaje desde -160 mV a +60 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV (**Figura 32**). Las corrientes se obtuvieron de las relaciones corriente vs tiempo del control y de los canales mutantes (**Figuras 34a**).

En la curva I-V (**Figura 34b**) se puede notar que los canales GIRK5 mutantes presentaron corrientes entrantes de K^+ registradas a potenciales de membrana más hiperpolarizantes con respecto al $E_K = 0$, y solo se observan corrientes salientes mínimas a voltajes despolarizantes con respecto a E_K . La capacitancia de la membrana plasmática juega un papel importante en los experimentos electrofisiológicos, pues entre mayor sea el área de la membrana celular mayor carga puede acumularse; por lo tanto la capacitancia es proporcional al área de la membrana celular. Como la membrana celular de los ovocitos de *Xenopus* está extensamente invaginada, una curva I-V de la relación densidad de corriente-voltaje, puede ser utilizada para asegurar que las diferencias en la magnitud de las corrientes iónicas registradas no sean debido a la mayor área de membrana presente en las células de los ovocitos; y así eliminar el tamaño de las células como fuente de error. La densidad de la corriente (amplitud de la corriente entre la capacitancia de la membrana) se expresa en pA/pF.

14.7. Efecto de las mutaciones puntuales en cada uno de los residuos de aminoácido en la secuencia consenso ESPQLI (EXXXLI) sobre la expresión funcional y la amplitud de la corriente entrante de los canales GIRK5.

Los residuos individuales E17, S18, P19, Q20, L21 e I22 se mutaron al aminoácido hidrofóbico alanina (A): GIRK5E17A, GIRK5S18A, GIRK5P19A, GIRK5Q20A, GIRK5L21A y GIRK5I22A (Figura 33). Se analizó su expresión funcional mediante el registró de las corrientes entrantes (Figura 34 y 35).

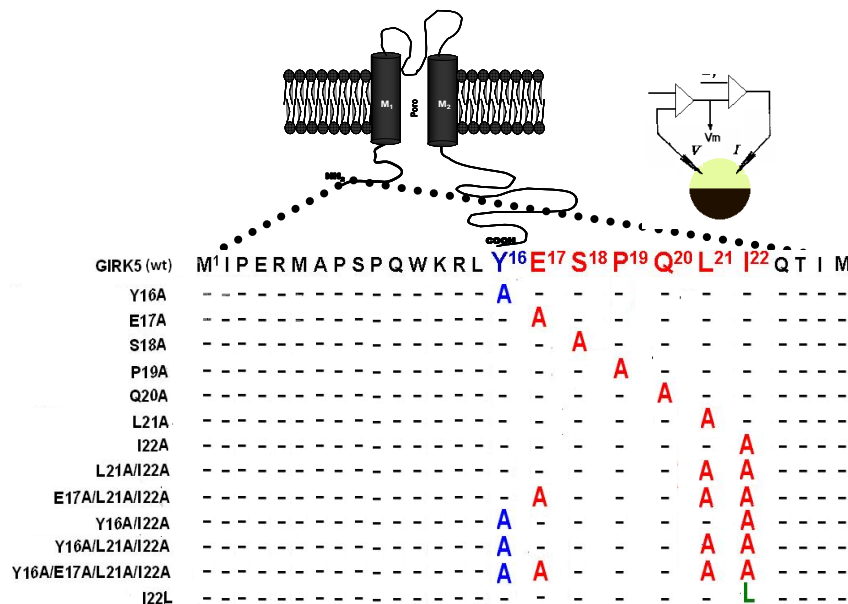


Figura 33. Secuencia de los primeros 25 aminoácidos del N-terminal del canal GIRK5 y sus mutantes. El motivo de dileucina [D/E]XXX[L/I] se indica en rojo. Los aminoácidos de alanina y leucina se representan como “A” y “L”, respectivamente.

De los canales mutantes E17A, S18A, P19A, Q20A, L21A e I22A (Figura 34), únicamente la mutación I22A fue funcional.

Las corrientes rectificadoras entrantes de los canales GIRK5 mutantes medidas a -160 mV no fueron estadísticamente significativas comparables a las corrientes endógenas de los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con 50 nL de H₂O (Figura 34 y 35; $p > 0.01$). Al registrar las corrientes en una solución de registro alta en K⁺ (118 mM); se encontró que los canales mutantes GIRK5S18A ($0.8 \pm 0.20 \mu\text{A}$), y GIRK5Q20A ($0.928 \pm 0.06 \mu\text{A}$) no mostraron corrientes (Figura 34b).

En la relación I-V se puede apreciar que no hay diferencias significativas en la magnitud de las corrientes (Figura 34b) del canal mutante GIRK5S18A y del canal endógeno GIRK5. Cuando se expresó el canal GIRK5P19A ($0.847 \pm 0.19 \mu\text{A}$) no se registraron corrientes

entrantes de K^+ (**Figura 34b**) ($p > 0.01$) respecto a los ovocitos control inyectados con agua ($0.654 \pm 0.17 \mu A$). Los canales GIRK5 mutantes son rectificadores fuertes ya que se observa una corriente saliente mínima (**Figura 34b**). Nuestros resultados indican que los aminoácidos S18, P19, y Q20 del motivo **ESPQLI** no regulan la expresión funcional del canal GIRK5, lo que concuerda con datos reportados en la literatura que muestran que estos residuos no son relevantes en el motivo **EXXXLI** en la localización polarizada de proteínas [Bonifacino y Traub; 2003].

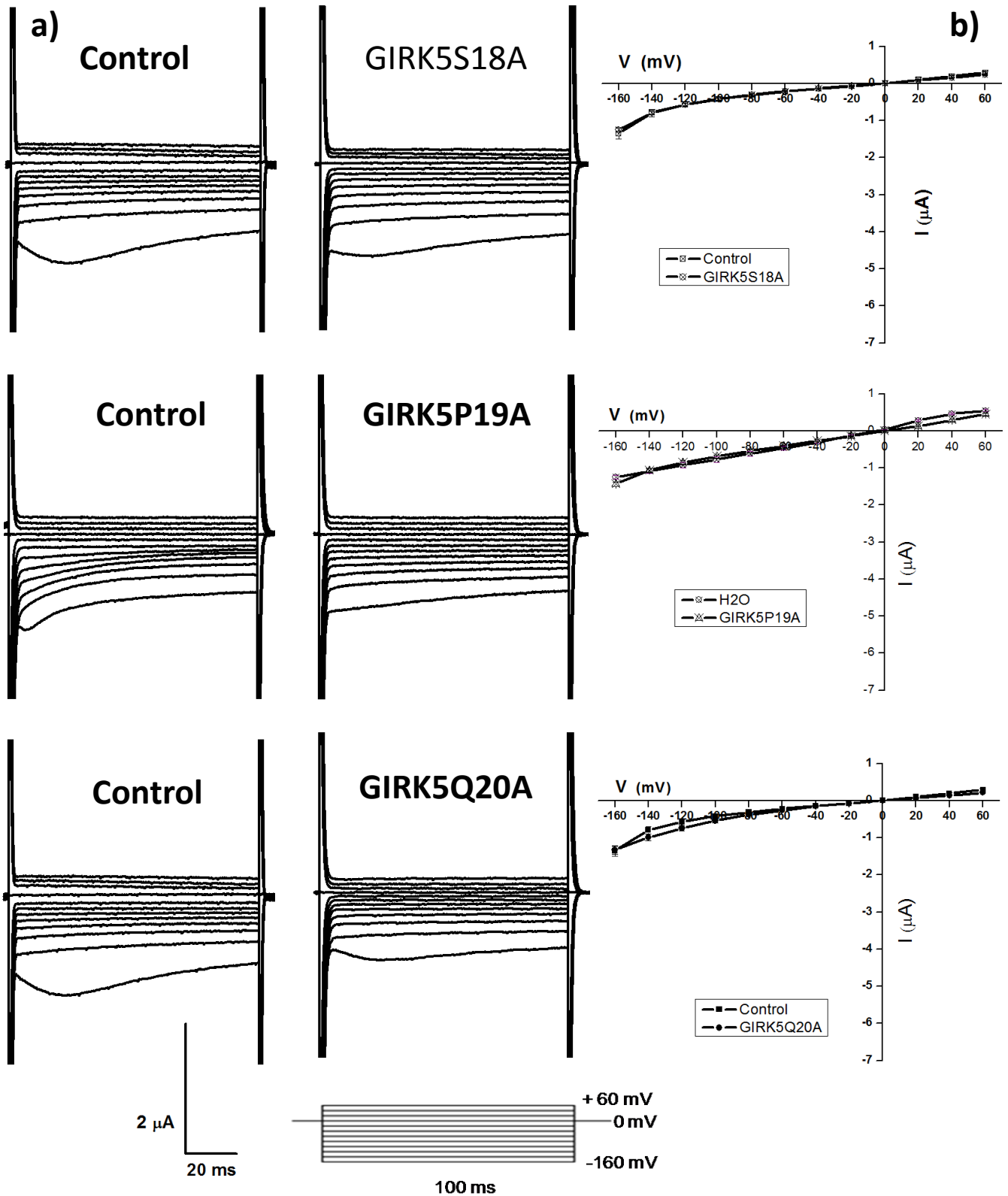


Figura 34. Expresión de los canales GIRK5S18A, GIRK5P19A GIRK5Q20A. a) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5 mutantes. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. b) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15). Las corrientes fueron registradas a -160 mV. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺.

14.7.1. La mutación del residuo de isoleucina (I22) de la secuencia ESPQLI produce la expresión funcional del canal GIRK5.

Con base en nuestra hipótesis, se esperaba que los canales mutantes: GIRK5E17A, GIRK5L21A y GIRK5I22A fueran funcionales, ya que las mutaciones en estos residuos afecta el tráfico hacia o desde la membrana plasmática [Rivera, et al. 2003; Guerriero, et al. 2008; Letourner y Klausner, 1992; Schulein, et al. 1998; VanLeeuwen, et al. 2003]. Sorprendentemente, no se registraron corrientes de los canales GIRK5E17A y GIRK5L21A ya que la magnitud de la corriente del canal GIRK5E17A fue de $-1.34 \mu\text{A} \pm 0.05$ y para el canal GIRK5L21A fue de $-1.19 \pm 0.11 \mu\text{A}$ (**Figura 35a y 35b**; respectivamente). Las corrientes registradas fueron de $-1.21 \mu\text{A} \pm 0.13 \mu\text{A}$ para los ovocitos inyectados con agua. En consecuencia, no se encontraron diferencias significativas entre las corrientes de los canales mutantes E17A y L21A y las de los controles ($p > 0.01$).

En cambio, las corrientes registradas en los ovocitos que expresan los canales GIRK5I22A ($2.94 \pm 0.23 \mu\text{A}$) muestran diferencias significativas respecto a los ovocitos control inyectados con agua ($0.82 \pm 0.04 \mu\text{A}$; $p < 0.01$) (**Figura 35**). En la relación I-V se pueden apreciar las diferencias en la magnitud de las corrientes rectificadoras entrantes (**Figura 35b**) del canal mutante GIRK5I22A y de los controles. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los residuos E17 y L21 individualmente no son relevantes en el motivo EXXXLI y que el residuo I22 es fundamental en la función del motivo EXXXLI.

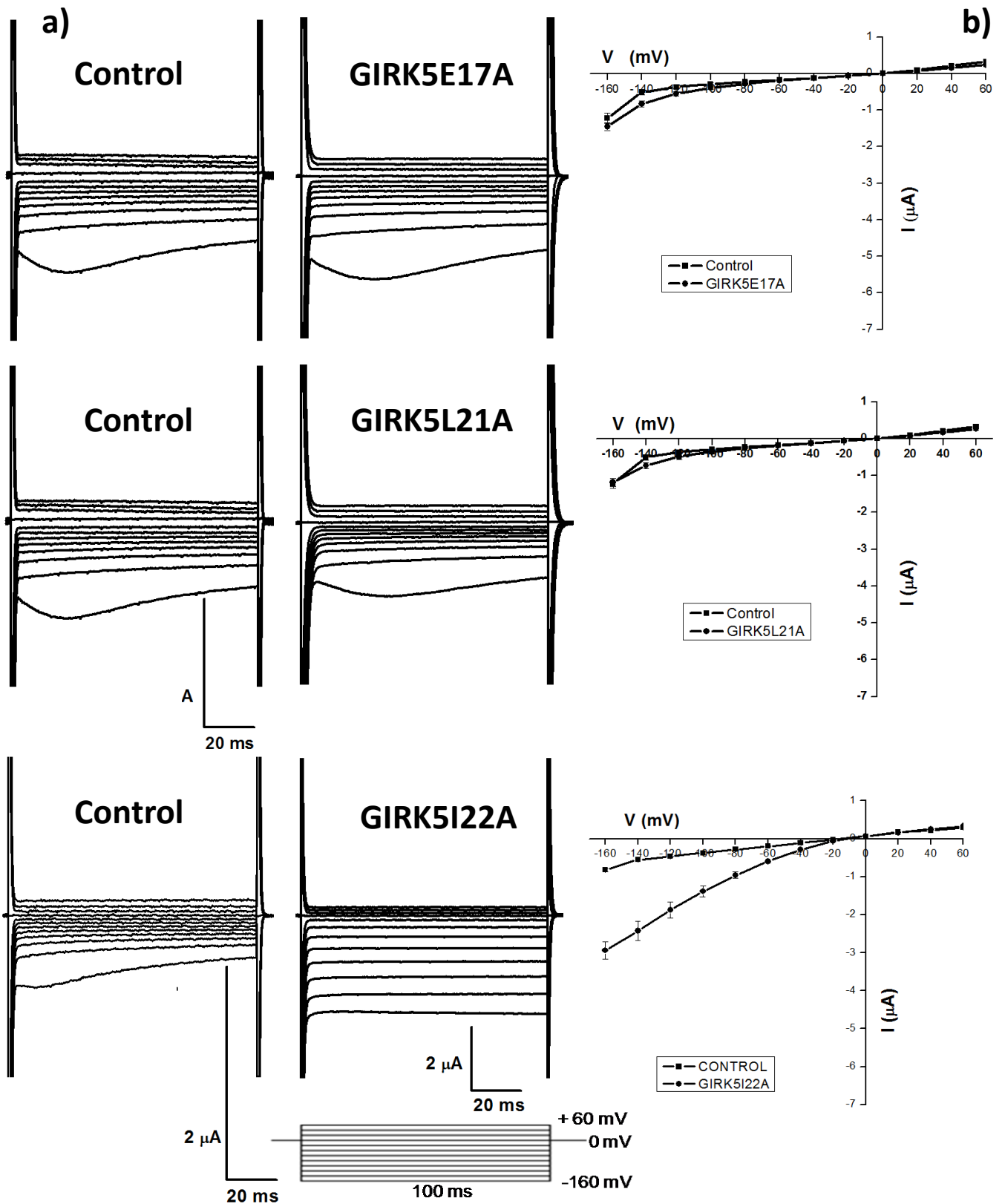
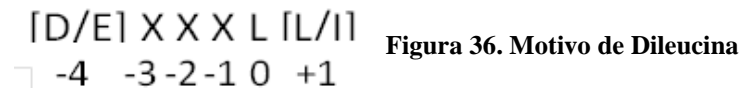


Figura 35. Expresión de los canales GIRK5E17A, GIRK5L21A GIRK5I22A. a) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5 mutantes. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. b) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15). Las corrientes fueron registradas a -160 mV. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺.

14.7.2. Efecto de mutaciones puntuales en múltiples residuos de aminoácidos en la secuencia consenso **ESPQLI** sobre la expresión funcional y la amplitud de la corriente de los canales **GIRK5**.

Se ha demostrado que en los motivos de localización basados en dileucina (**Figura 36**), el aminoácido ácido (D/E) en la posición -4, leucina (L) en la posición 0, mientras que para la posición +1, una leucina(L) o Isoleucina(I) son necesarios para mediar el transporte en el sistema endosomal/lisosomal [Letourner y Klausner, 1992; Pond, *et al.* 1995; Sandoval, *et al.* 2000, Tabuchi, *et al.* 2002; Ho Koh, *et al.* 2005]; o/y en la localización basolateral en las células polarizadas [Hunziker y Fumey, 1994]. Para determinar el efecto de la sustitución de más de un aminoácido en el motivo de dileucina, se realizaron mutaciones en dos (L21/I22) o tres aminoácidos (E17/L21/I22) en la secuencia **ESPQLI** por alanina (**Figura 33**).



En el canal con la doble mutante **GIRK5L21AI22A** se registró un pequeño, pero reproducible incremento de la corriente de K^+ a -160 mV, pasando de $0.85 \pm 0.23 \mu A$ en los ovocitos control a $3.05 \pm 0.21 \mu A$ ($p < 0.01$). La mutación triple **E17AL21AI22A** también presentó un incremento de la corriente de $0.85 \pm 0.23 \mu A$ a $3.14 \pm 0.22 \mu A$; en los ovocitos inyectados con agua y en los triple mutantes respectivamente ($p < 0.01$; **Figura 37a y 37b**). La prueba estadística ANOVA nos indica que las corrientes registradas con la doble y triple mutante no son significativamente diferentes entre ellas ($p < 0.01$); pero son diferentes comparadas con el nivel de corriente registrado en los ovocitos control. En la relación I-V se pueden apreciar las diferencias en la magnitud de las corrientes (**Figura 37b**) del canal mutante **L21AI22A** y los controles. Por consiguiente, la sustitución múltiple de los aminoácidos **L21/I22** y **E17/L21/I22** en el motivo **EXXXLI**, resultó en un aumento moderado del tráfico de los canales **GIRK5**. Cabe mencionar que el lote de ovocitos utilizado fue el mismo para las mutantes **E17AL21AI22A**, **L21AI22A** e **I22A**. La prueba estadística ANOVA nos indica que las corrientes registradas en la doble y triple mutante no son significativamente diferentes entre ellas ($p < 0.01$) y tampoco son diferentes comparadas con el nivel de corriente registrado en los canales **I22A** (**Figura 37b**). Estos resultados sugieren que el residuo de isoleucina 22 (**I22**) es dominante sobre la leucina 21 (**L21**) y glutamato 17 (**E17**) en el motivo **ESPQLI**.

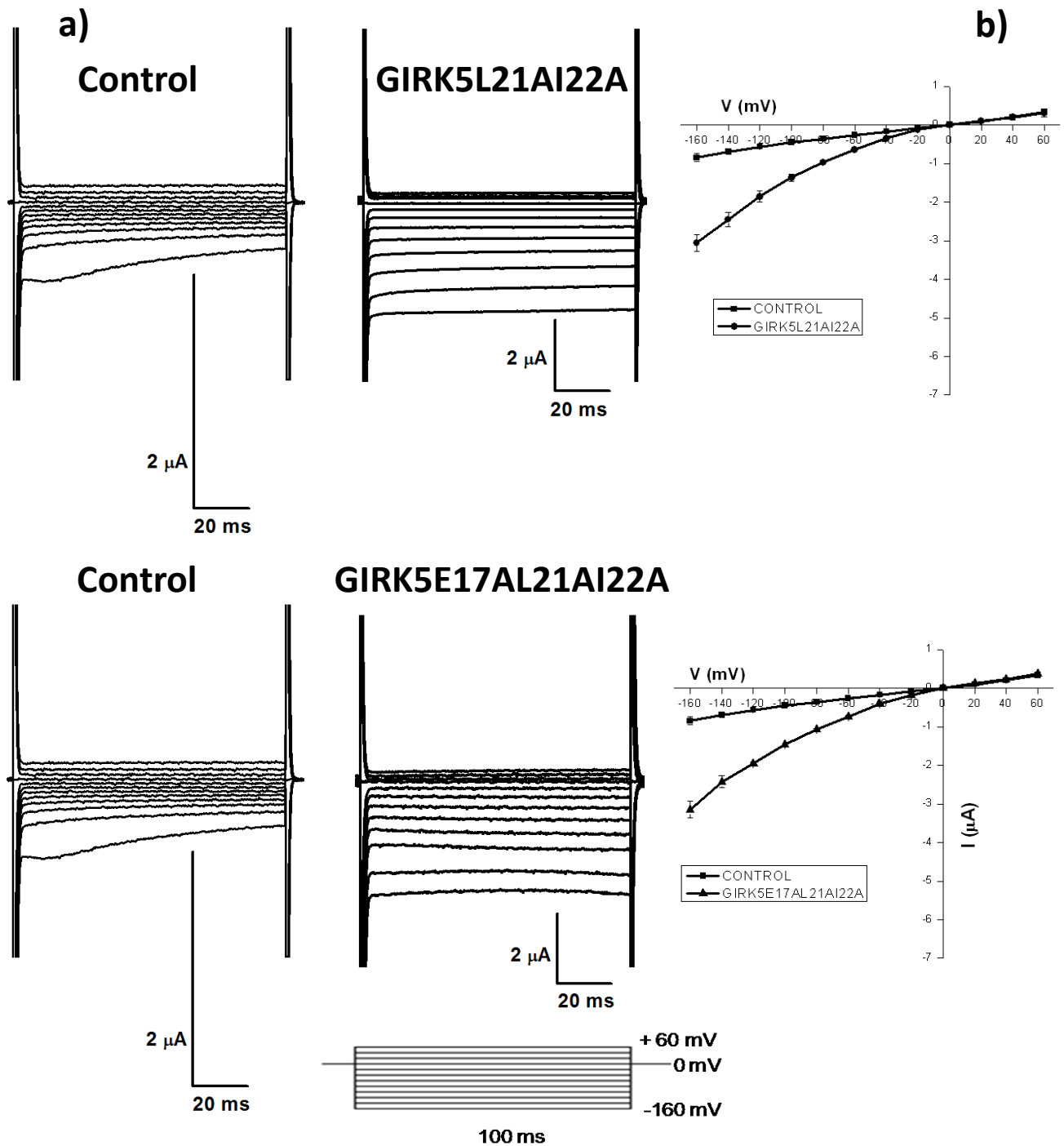


Figura 37. Expresión de los canales GIRK5L21AI22A y GIRK5E17AL21AI22A. a) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5 mutantes. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. b) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15). Las corrientes fueron registradas a -160 mV. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺.

14.7.3.. El cambio paulatino del motivo dileucina resulta en un aumento gradual de la expresión de los canales mutantes.

La expresión funcional del canal GIRK5 depende de la desfosforilación de la tirosina 16 [Mora y Escobar, 2005]. El motivo del tipo dileucina ESPQLI esta acotada por la tirosina fosforilable (Y16) YESPQLI. Otra forma de estudiar el impacto del motivo dileucina en el tráfico del canal GIRK5 fue incluir la mutación de la Y16 por alanina en cada una de las mutaciones del motivo. Lo que asegura niveles de expresión razonables del canal en la membrana. Se realizaron mutaciones dobles (Y16A/I22A), triples (Y16A/L21A/I22A) y cuádruples (Y16A/E17A/L21A/I22A) en la secuencia Y16ESPQLI (**Figura 38**). Se esperaba que todos los canales serían funcionales debido a la mutación Y16A, sin embargo se registraron niveles distintos de corriente con diferencias significativas ($p < 0.01$) respecto a las corrientes registradas en los ovocitos control (**Figura 38a y 38b**). Las corriente de Y16AI22A presenta diferencias significativas respecto a la registrada en los ovocitos inyectados con 50 nl de H₂O, siendo éstas de $3.49 \pm 0.25 \mu\text{A}$ y $0.890 \pm 0.05 \mu\text{A}$, respectivamente ($p < 0.01$; **Figura 38b**). Los canales Y16AL21AI22A y Y16AE17AL21AI22A produjeron corrientes grandes de $4.51 \pm 0.19 \mu\text{A}$ y $8.2 \pm 0.06 \mu\text{A}$, respectivamente (**Figura 38a y 38b**). La corriente promedio de los ovocitos control inyectados con agua fue de $0.56 \pm 0.17 \mu\text{A}$ ($p < 0.01$). En la relación I-V se puede apreciar que hay diferencias significativas en la magnitud de las corrientes de lo canales mutantes (Y16AL21AI22A, Y16E17AAL21AI22A) y el canal endógeno GIRK5 (**Figura 38b**).

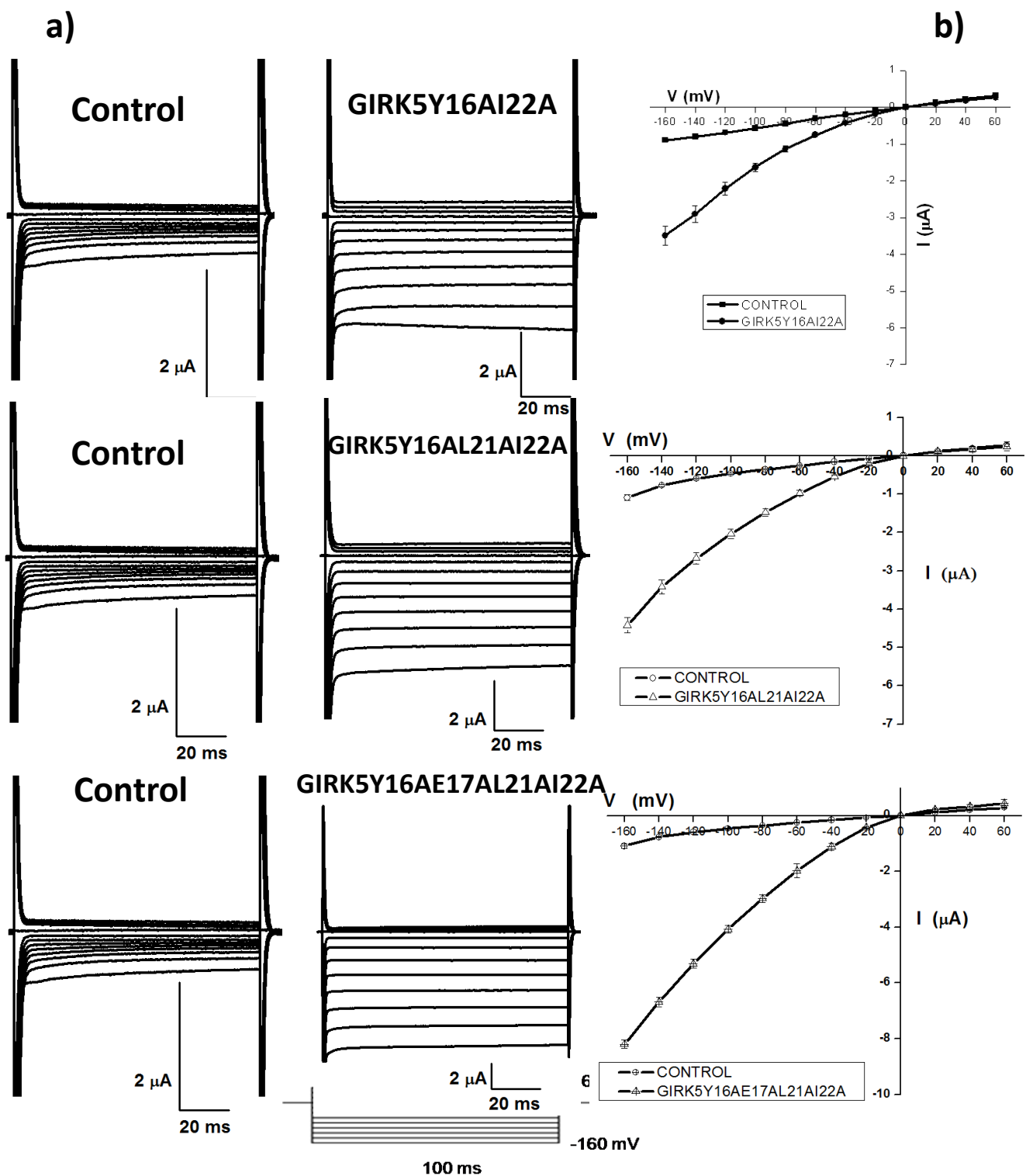


Figura 38. Expresión de los canales GIRK5Y16AI22A, GIRK5Y16AL21AI22A y GIRK5Y16AE17AL21AI22A. a) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5 mutantes. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. b) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15). La amplitud de las corrientes se midió a -160 mV. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺.

En la **figura 39** se compara el nivel de las corrientes normalizadas (I/I_0) respecto a sus controles (**Figura 39**). Todas las mutantes presentaron un aumento significativo de la corriente respecto del canal GIRK5 endógeno en los ovocitos control ($p < 0.01$, Prueba T de Student's).

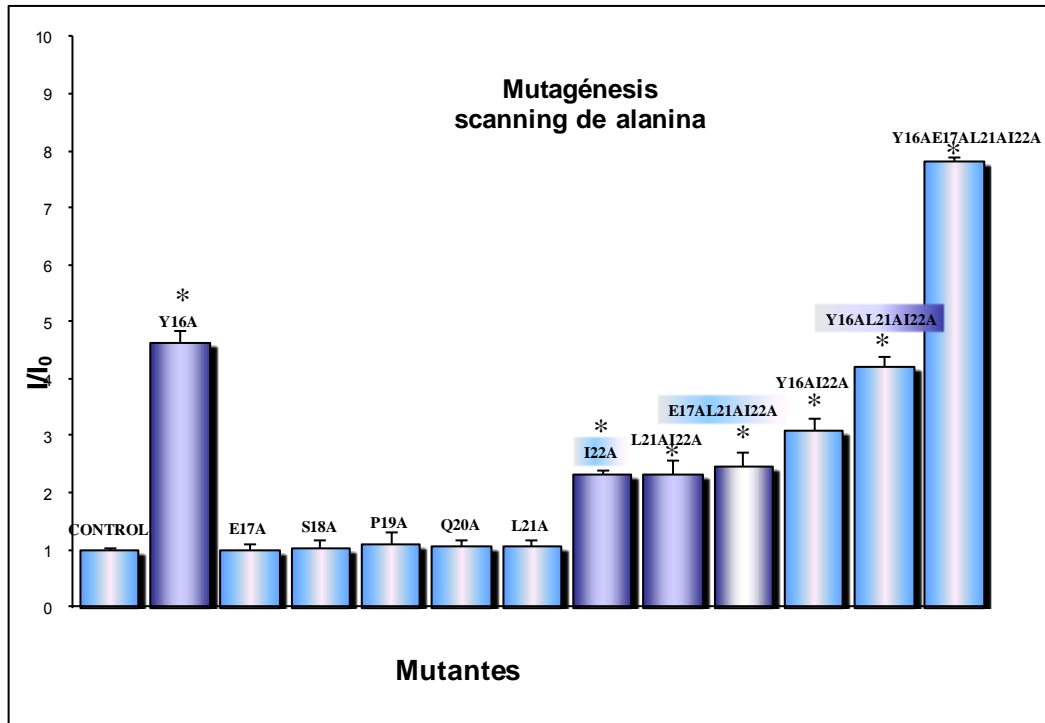


Figura 39. Efecto de las mutaciones puntuales en el motivo de dileucina ESPQLI del canal GIRK5. Comparación de la corriente rectificadora entrante registrada en ovocitos inyectados con H₂O (control: GIRK5 wt) y ovocitos que expresan de los canales GIRK5 mutantes (indicados sobre las barras). Las corrientes fueron normalizadas respecto a las corrientes registradas en los controles (I/I_0). Corrientes registradas en -160 mV de un número de experimentos independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15 ovocitos). Registros de la corriente del canal GIRK5Y16A tomado de Mora y Escobar, 2005 La barra de error corresponde al promedio \pm error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas comparadas con el control ($p < 0.01$).

La **Figura 39** muestra que conforme aumenta el número de residuos mutados en la secuencia Y16ESPQLI22, aumento el nivel de la corriente ($p < 0.01$ *). Con estas combinaciones podemos determinar la importancia de los residuos E17, L21 e I22 en la secuencia EXXXLI. El canal que pierde el motivo dileucina, Y16AE17AL21AI22A, incrementa el número de canales GIRK5 mutantes en membrana plasmática, es el de mayor expresión funcional, lo que sugiere que se trafica mejor a la membrana plasmática. El canal Y16AL21AI22A conserva el residuo de glutamato 17 en el motivo y el nivel de corriente

registrado es menor, pero aun así se observa una densidad alta de canales GIRK5 en la membrana. El canal Y16AI22A contribuye con un menor número de canales funcionales en la membrana plasmática. En conjunto, estos resultados muestran que una vez que se desfosforila el canal GIRK5, todos los residuos del motivo contribuyen en el tráfico del canal a la membrana plasmática.

14.7.4. Importancia de la I22 en el motivo dileucina del canal GIRK5 en la membrana plasmática del ovocito de *X. laevis*.

Los aminoácidos leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), y valina (V) pueden estar presentes en la posición +1 del motivo dileucina (**Figura 36**); la sustitución en esta posición de cualquiera de estos aminoácidos por otro de ellos, no altera la función del motivo [Sandoval et al; 1994, Berg et al; 1994, Tabuchi et al; 2002].

Para determinar que importancia tiene el residuo de isoleucina 22 en el motivo de dileucina, se mutó la I22 por un residuo de leucina (I22L, **Figura 33**) y se midió su expresión funcional. Con base en resultados previos se esperaba que el canal mutante GIRK5I22L no fuese funcional ya que no rompe con el motivo de dileucina (**Figura 33, 40**).

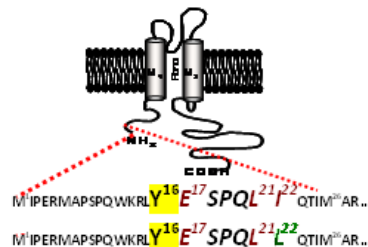


Figura 40. Mutación puntual de la Isoleucina 22 por un residuo de Leucina

Interesantemente, se registraron corrientes entrantes de K^+ en los canales mutantes GIRK5I22L de $2.94 \pm 0.23 \mu A$ que mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) respecto a las corrientes registradas de los ovocitos control $0.89 \pm 0.05 \mu A$ (**Figura 41a y 4b**). Lo que demuestra que la sustitución del residuo de la isoleucina 22 (I) por una leucina (L) rompe el motivo, ya que hay expresión funcional del canal GIRK5 mutante. Estos resultados sugieren que es de suma importancia el residuo en la posición +1 del motivo de dileucina en el N-terminal del canal GIRK5. Sería importante demostrar si se presenta el mismo efecto con otros aminoácidos hidrofóbicos como metionina (M), y valina (V).

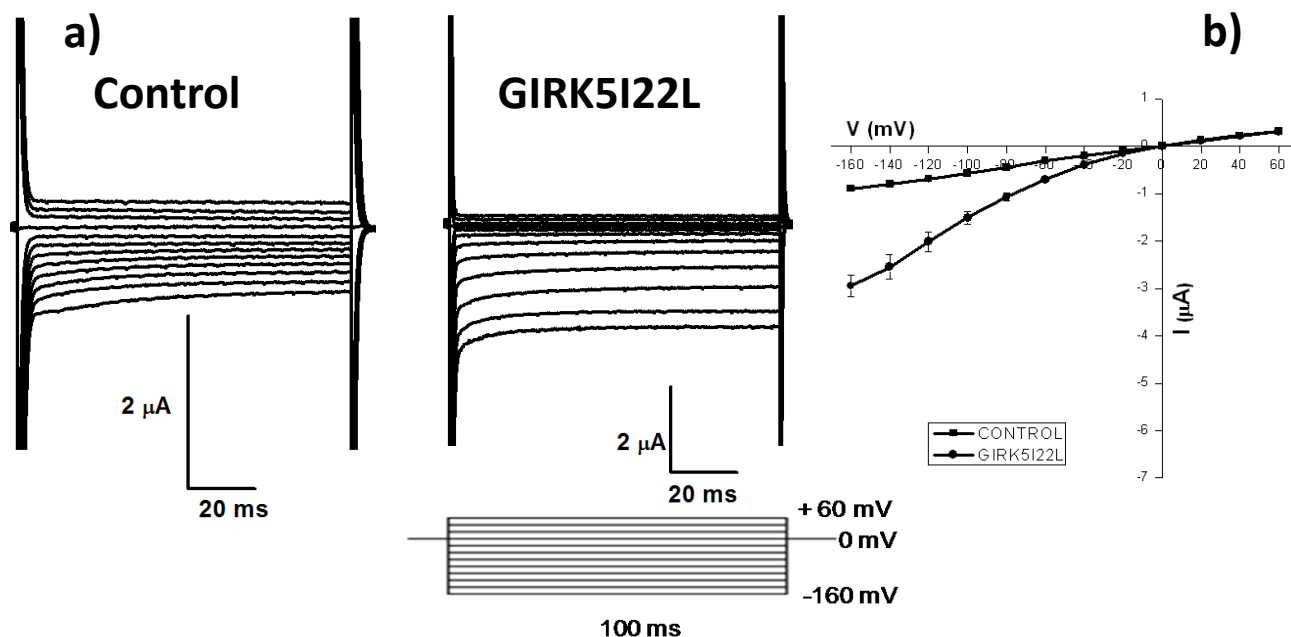


Figura 41. Expresión de los canales GIRK5I22L. a) Registros de las corrientes macroscópicas de los ovocitos inyectados con 25 ng de ARNm de los canales GIRK5 mutantes. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. b) Curva corriente (I) contra voltaje (V) de un número independiente de ovocitos promediados (n=12 a 15). La amplitud de las corrientes se midió a -160 mV. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺.

En conjunto, estos resultados implican que las mutaciones en el motivo dileucina del N-terminal del canal GIRK5 inducen la expresión funcional y sugiere que los residuos E17, L21 e I22 actúan de forma cooperativa para que la señal del motivo pueda ser reconocida cuando la Y16 no esta fosforilada; y que el residuo en la posición +1 es dominante en el motivo **ESPQLI**.

De la misma manera como se ha observado para los canales Δ 25GIRK5 y GIRK5Y16A, en los ovocitos inyectados con el cRNA de los canales GIRK5 mutantes se registraron corrientes entrantes sin la coinyección del cRNA del receptor muscarínico o de las subunidades de Proteínas G (Figura 35A, 37A, 38A y 41A). Los canales Δ 25GIRK5 y GIRK5Y16A son activados por una posa endógena de proteínas G $\beta\gamma$ libres en los ovocitos de *Xenopus laevis* [Salvador, et al 2005; Mora y Escobar, 2005]. Se demostró que la

corriente registrada en los ovocitos coinyectados con el ARNc del receptor AChm₂ y el de los canales GIRK5Y16A y Δ 25GIRK5 aumenta cuando se activa al receptor con carbacol, en contraste con la falta de expresión funcional observada en los ovocitos control y en los coinyectados con el cRNA del canal GIRK5 y del receptor. Al coexpresar los canales GIRK5Y16A y Δ 25GIRK5 con la subunidad G α_{i2} se observa decremento significativo en la corriente entrante de estos canales [Hedin et al. 1996; Salvador et al. 2003, Mora y Escobar, 2005]. Por otra parte, Mora y Escobar (2005) demostraron que al inyectar cantidades equivalentes del cRNA de los canales GIRK5 y Δ 25GIRK5 (1:1), la isoforma GIRK5 impide la expresión funcional de la isoforma Δ 25GIRK5. Esto sugiere que la expresión funcional de los canales GIRK5 mutantes (**Figura 35A, 37A, 38A y 41A**) no fue causada por su asociación con la subunidad GIRK5 endógena, esto se corrobora con el aumento del nivel de la corriente respecto al tiempo de expresión de los canales mutantes, ya que entre más días que transcurrían después de la inyección del RNA, mayor corriente entrante fue registrada (datos no mostrados) y bajo las mismas condiciones en los ovocitos control el nivel de la corriente endógena no aumentó.

15. Discusión

La mayoría de los estudios de los canales iónicos se han enfocado a entender su farmacología y la regulación de su actividad. Para entender cómo se regula el número de los canales en la membrana plasmática es importante identificar los mecanismos moleculares involucrados en la vía secretora y en la vía endocítica de los canales iónicos, así en los últimos años el estudio del tráfico de los canales iónicos se ha convertido en un campo emergente [Heusser y Schwappach, 2005; Sivaprasadarao et al, 2007].

En particular, el tráfico intracelular de los canales GIRKs de mamíferos fue descrito por el grupo de la Dra. Lily Jan [**Tabla 5**, Kennedy, *et al.* 1999; Ma, *et al.* 2001 y 2002].

A diferencia de los canales GIRK de mamífero, el canal GIRK5 de los ovocitos de *Xenopus laevis* tiene un NH₂-terminal más largo (25 aminoácidos) y puede formar homomultímeros funcionales. Nuestro laboratorio reportó por primera vez que la expresión funcional del canal GIRK5 de ovocitos es dependiente de la desfosforilación de la tirosina Y16A [Mora y Escobar, 2005]. Justo la tirosina Y16 acota la secuencia “**ESPQLI**” correspondiente a un motivo dileucina del tipo [D/E]XXXL[L/I]. El motivo de dileucina está involucrado en el tráfico hacia el sistema endosomal/lisosomal y/o la distribución polarizada en las células

epiteliales y las neuronas, de numerosos receptores y transportadores [Bello, et al. 2001; Bonifacino y Traub, 2003; Stockklausner y Klöcker, 2003; Letourneur y Klausner, 1992; Hunziker y Fumey, 1994; Miranda, et al. 2001]. En canales iónicos el motivo dileucina del tipo “**LL**” es necesario para la localización dendrítica de los canales de potasio “Kv4.2” [Rivera, et al. 2003], en el C-terminal del canal de sodio “Nav1.2” el motivo **IL** actúa como un determinante axonal y como una señal de internalización [Garrido, et al. 2001], y en los canales Kir2.3 el motivo **II** localizado en el C-terminal favorece internalización [Mason, et al. 2008]. El motivo de dileucina del tipo **LEL** en el canal de potasio KCNQ1 [Jespersen, 2004] y el motivo **LL** en el C-terminal del canal de cloro CIC-2 [Peña-Münzenmayer G, 2005], localiza a estos canales en la membrana basolateral de las células epiteliales. Llama la atención que el motivo del tipo [D/E]XXXL[L/I] no ha sido descrito en los canales iónicos.

15.1. Papel de los residuos de aminoácido del motivo de dileucina EXXXLI en la expresión funcional de los canales GIRK5.

Los primeros 25 aminoácidos del N-terminal del canal GIRK5 contienen un motivo dileucina con un aminoácido de naturaleza ácida (E) en la posición 17, que corresponde al motivo EXXXLI [Bonifacino y Traub, 2003]. Se introdujeron las mutaciones puntuales de alanina en el motivo **E17SPQL21I22** para determinar de que manera la “ruptura” del motivo dileucina afecta la expresión de los canales GIRK5 en la membrana plasmática de los ovocitos. En el motivo del tipo dileucina [D/E]XXXL[L/I], X es cualquier aminoácido, por ende, cualquier aminoácido que ocupe esta posición no interviene en la función de la señal de tráfico. El análisis electrofisiológico de los canales GIRK5 mutantes, reveló el efecto de cada uno de los aminoácidos de la secuencia ESPQLI del NH₂-terminal en la amplitud de la corriente de K⁺. Como era de esperar los canales mutantes S18A, P19A, Q20A no fueron funcionales (**Figura 34A y 39A**). Por otra parte, se ha demostrado que individualmente los residuos hidrofóbicos (leucina e isoleucina), así como el residuo ácido (glutamato o aspartato), tienen un papel crítico en la función de la señal, ya que influyen en el tráfico de las proteínas de membrana tanto en la ruta endocítica como en la ruta secretora [Pandey, 2009]. Los canales E17A y L21A no fueron funcionales (**Figura 35A y 39**), lo cual sugiere que estos residuos del motivo no son relevantes en la vía secretora.

Por el contrario, la mutación del residuo I22 mostró un aumento pequeño pero significativo en la corriente (**Figura 35A y 39**) y por consiguiente, en la expresión de los canales en la superficie de los ovocitos. En conclusión, solo el residuo de isoleucina I22 en el NH₂ terminal del canal GIRK5 es relevante en la operación del motivo **ESPQLI** en el tráfico a la membrana plasmática del ovocito.

15.2. La ruptura del motivo dileucina en más de un residuo resulta en la expresión funcional del canal mutante GIRK5I22A.

La sustitución de los aminoácidos L21/I22 y E17/L21/I22 por alanina en el motivo EXXXLI (**Figura 33**) provocó un aumento moderado de la amplitud de la corriente de K⁺ de los canales mutantes L21AI22A (**Figura 37 y 39**; EXXXAA) y E17AL21AI22A (**Figura 37 y 39**; AXXXAA). Al comparar el nivel de corriente de estas mutantes con la mutante I22A, se puede concluir que es la isoleucina I22A la responsable de la función del motivo. Estos resultados sugieren que la isoleucina I22 es determinante en la retención del canal en el retículo endoplásmico [datos no publicados, Díaz Bello, et al. 2012] o bien para su endocitosis. Se sabe que el segundo residuo hidrofóbico (I22) participa en la internalización de las proteínas de membrana [Rivera, et al. 2003; Guerriero, et al. 2008; Letourner y Klausner, 1992]. Sin embargo, nuestros resultados apoyan el hecho de que se favorece la salida de la mutante I22A del retículo endoplásmico y su permanencia en la membrana plasmática [Schulein, et al. 1998; VanLeeuwen, et al. 2003, Mikosch, et al. 2006, datos no publicados, Díaz Bello, et al. 2012]. Sabemos que en el canal GIRK5 wt la fosforilación de la Y16A inhibe su expresión funcional. Nuestros resultados muestran que también la isoleucina I22 es importante en su localización subcelular.

Se ha demostrado que los residuos que acotan a un motivo de dileucina pueden participar ya sea en la estabilización de una estructura de giro (β plegada), o la de una α hélice (el motivo de dileucina forma parte de una estructura secundaria [Pond, et al, 1995; Hofmann, et al. 1999]; o bien en la modulación de la afinidad con los complejos adaptadores (AP) [Bonifacino y Traub, 2003]. Es una característica de la secuencia LL el estar rodeada de residuos de aminoácidos polares y / o aminoácidos cargados. Sin embargo, una secuencia en particular río arriba de los residuos dileucina [⁴D/E]-³X-²X-¹X⁰L⁺¹[L/I] no es absolutamente requerida [Pandey, 2009]. Los aminoácidos inmediatamente río arriba y río

abajo de la leucina en posición 0 pueden afectar la especificidad de la interacción con diferentes complejos adaptadores (AP-1 a AP-4) [Doray, et al. 2007, Rodionov, et al 2002]. Se ha demostrado que incluso los residuos "no críticos" del motivo pueden contribuir en la determinación de la unión del adaptador, y de hecho se distinguen entre ellos. Es por ello que las proteínas que contienen diversos motivos basados en dileucina se pueden localizar en endosomas /lisosomas, o en la membrana plasmática basolateral [Rodionov, et al. 2002]. Con base en lo anterior, los residuos S18, P19 y Q20 podrían tener un efecto en la unión específica de los residuos E17, L21 e I22 con los complejos adaptadores cuando la Y16 no está fosforilada. Por ejemplo, el motivo del tipo dileucina [D/E]XXXL[L/I] se encuentra en los transportadores de glucosa GLUT8 y GLUT12. Sin embargo, estos transportadores GLUT no comparten la misma localización celular. La endocitosis y/o localización basolateral depende de la posición de un residuo de prolina (P) en la secuencia $^{-3}X^{-2}X^{-1}X$ del motivo dileucina $[-^4D/E]^{-3}X^{-2}X^{-1}X^0L^{+1}[L/I]$ [Hunziker y Fumey, 1994; Newton y Simister, 2005]. La prolina en posición -2 (**XPX**) dirige al transportador GLUT12 a la membrana plasmática y al aparato de Golgi, al contrario, la prolina en la posición -1 (**XXP**) dirige al transportador GLUT8 a los lisosomas [Aerni-Flessner, et al. 2011].

15.3. La ruptura del motivo dileucina resulta en un aumento gradual de la expresión del canal GIRK5

Los resultados de este estudio revelan el papel del aminoácido ácido E17 y de los aminoácidos hidrofóbicos L21 e I22. Como se demostró, el tráfico del canal GIRK5 a la membrana plasmática de ovocitos depende de la fosforilación de la tirosina (Y16) en su N-terminal. La Y16 al ser fosforilada mantiene al canal GIRK5 retenido en RE [datos no publicados, Díaz Bello, et al. 2012]. El motivo del tipo dileucina E17SPQLI esta acotado por la tirosina fosforilable (Y16). Primero decidimos incluir la mutación de la Y16 por alanina para mantener niveles de expresión altos de los canales GIRK5 mutantes en la membrana plasmática de los ovocitos. Los resultados indicaron que cada uno de los tres aminoácidos tiene un impacto diferente en la eficacia del motivo. El canal Y16E17AAL21AI22A que carece de todo el motivo dileucina presentó la mayor amplitud de corriente: Y16AE17AL21AI22A > Y16AL21AI22A > Y16AI22A (**Figura 38 y 39**). El análisis electrofisiológico de los canales mutantes no permite determinar si el motivo de

dileucina participa en la internalización o en la vía secretora del canal GIRK5 en los ovocitos. Los motivos dileucina de la forma [DE]XXXL[LI] son señales reconocidas por los complejos APs en numerosas vías diferentes [Heilker, et al. 1996; Honing, et al 1998; Le Borgne, et al. 1998; Peden, et al. 2001]. AP-1 y AP-3 median la localización a nivel del TGN y/o endosomas [Cancino, et al. 2007]. El proceso de internalización utiliza vesículas recubiertas de clatrina/AP-2 [Mousavi, et al. 2004; Lodish, et al. 2004; Gong, et al. 2007]. La señal [DE]XXXL[LI] favorece el transporte retrógrado de proteínas que involucra al complejo adaptador de proteínas 2 (AP-2) [Kinlough, et al. 2004]. Los adaptadores AP-1B [Ohno, et al. 1999] y AP-4 [Simmental, et al. 2002] participan en la localización basolateral o apical. El hecho de que el canal Y16AI22A es funcional, sugiere que algunos de estos canales se transportan a la membrana plasmática o que la internalización de estos canales se inhibe. Cualquiera de estas posibilidades se puede deber a una débil interacción de los aminoácidos E17, S18, P19, Q20 y L21, que aún se mantienen en el motivo dileucina, con los complejos adaptadores. Esta hipótesis se confirma con el aumento del nivel de corriente de los canales con tres y cuatro mutaciones, (Y16AL21AI22A y Y16AE17AL21AI22A, respectivamente). Es por eso que el canal Y16AL21AI22A (con 4 aminoácidos mutados) es el que presenta el mayor nivel de corriente y apoya que la unión de los canales GIRK5 a los complejos adaptadores involucra a los tres aminoácidos del motivo: E17, L21 e I22A. Nuestros resultados apoyan que los residuos del motivo actúan de forma cooperativa cuando la Y16 no esta fosforilada. Este mecanismo permite un reconocimiento específico de la maquinaria de tráfico intracelular y por lo tanto el ajuste de la densidad de canales iónicos en la membrana plasmática. El motivo del canal GIRK5 es, por tanto, la secuencia EXXXLI y/o YEXXXLI.

15.4. Importancia de la I22 en el motivo dileucina del canal GIRK5 en la membrana plasmática del ovocito de *X. laevis*.

Los aminoácidos hidrofóbicos leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), y valina (V) se han identificado en el segundo residuo de aminoácido en la posición +1 del motivo dileucina. La sustitución en la posición +1 de cualquiera de estos aminoácidos por otro de ellos no altera la función del motivo [Sandoval et al. 1994, Berg et al. 1994, Tabuchi et al. 2002; Pandey 2009; Dietrich, et al. 2008]. Sin embargo, para nuestra gran sorpresa, la sustitución del residuo I22 por L22 anuló la eficacia del motivo EXXXL en la inhibición de

la expresión funcional. La mutación del residuo I22 a alanina produjo un aumento discreto del nivel de corriente rectificadora entrante (**Figura 35**); y una respuesta similar se observó cuando isoleucina 22 fue mutada a leucina (**Figura 40**). Al ser funcional la mutante I22L sugiere que sí es importante la isoleucina I22 en el motivo. Aunque han demostrado que los aminoácidos hidrofóbicos (L, I, M y V) pueden ser los residuos de aminoácido en la posición +1 en el motivo $[-^4D/E]^{-3}X^{-2}X^{-1}X^0L^{+1}[L/I]$, y que el motivo funciona de la misma manera, Dietrich y Colaboradores (2008) probaron en el motivo de dileucina "DKQTLL" en la subunidad CD3 γ del receptor TCR (TCR; receptor de células T), que la leucina en la posición +1 puede remplazarse por los aminoácidos hidrofóbicos con un orden de prioridad: leucina = isoleucina > methionina > fenilalanina, en vista de lo cual, una secuencia en particular de los residuos dileucina no es absolutamente necesaria [Dietrich, et al. 2008; Pandey, 2009].

Nuestros resultados indican que el residuo de leucina no puede sustituir al de isoleucina en la posición +1 de esta secuencia, a pesar de que estos dos aminoácidos tienen el mismo tamaño de la cadena lateral, pero con índice de hidrofobicidad diferente (4.2 para isoleucina y 3.8 para leucina), lo que sugiere que el reconocimiento por los complejos APs de estos dos residuos hidrofóbicos es muy específico y dependiente de la naturaleza del aminoácido, a tal grado que puede diferenciarse su preferencia por el residuo I22 [Akasaki, 2010]. Una posibilidad es que la maquinaria de clasificación reconozca estrictamente la identidad de la isoleucina 22 para controlar la especificidad de la interacción de los residuos E17 y L21 con los sitios separados de los complejos APs [Mason, 2008]. De este modo, la señal LI es más eficiente que la señal LL. Así, concluimos que la eficacia del motivo ESPQLI en el N-terminal del canal GIRK5 está determinada por la naturaleza del aminoácido en la posición 22. Incluso, el residuo I22 resultó ser dominante sobre los residuos E17 y L21 en el motivo EXXXLI y es probable que estos residuos integren un papel auxiliar en la función del motivo de dileucina.

Los resultados sugieren que los residuos E17, L21 e I22 actúan en forma cooperativa y que el residuo de isoleucina 22 (I22) es dominante en el motivo **ESPQLI**. Por consiguiente, a pesar de que la fosforilación de la Y16 inhibe la expresión funcional del canal GIRK5, el motivo EXXXLI también contribuye en la retención del canal en el retículo endoplásmico [Tesis de Doctorado de Beatriz Díaz Bello, 2012].

16. Conclusiones

- ✓ La técnica de fijación de voltaje permitió medir las corrientes de K^+ de los canales GIRK5 mutantes. Partimos de la base de que las corrientes iónicas son proporcionales a la densidad de los canales y, en consecuencia, pudimos determinar el efecto de cada aminoácido del motivo en la densidad de los canales en la membrana plasmática.
- ✓ Los resultados revelan que la secuencia ESPQLI es un motivo del tipo EXXXLI en el canal GIRK5.
- ✓ El motivo EXXXLI es esencial para inhibir el tráfico del canal GIRK5 a la membrana plasmática de los ovocitos.
- ✓ Los residuos E17 y L21 individualmente no son relevantes en el motivo EXXXLI.
- ✓ El residuo I22 es fundamental en la función del motivo EXXXLI
- ✓ Los canales mutantes GIRK5Y16AI22A, GIRK5Y16AL21AI22A y GIRK5Y16AE17AL21AI22A son funcionales. Los canales mutantes mostraron un aumento gradual en el nivel de corriente de rectificación entrante que fue determinada por el número de residuos de aminoácidos mutados: GIRK5Y16AL21AI22A > GIRK5L21AI22A > GIRK5I22A.
- ✓ El residuo de isoleucina 22 (I22) es más dominante sobre la leucina 21 (L21) y el glutamato 17 (E17) en el motivo ESPQLI. Los aminoácidos E17, L21 e I22 actúan de forma cooperativa cuando la Y16 no está fosforilada para una eficiente operación del motivo de dileucina EXXXLI en el NH₂-terminal del canal GIRK5.
- ✓ Los canales mutantes GIRK5I22L son funcionales por lo que se concluye que el residuo de isoleucina 22 no puede ser remplazado por un residuo de leucina de la secuencia EXXXLI. Por consiguiente, la eficacia del motivo ESPQLI en el N-terminal del canal GIRK5 esta determinada por la naturaleza del aminoácido en la posición 22.

17. Perspectivas

Definir si el canal GIRK5 se localiza directamente en endosomas, o si es dirigido a la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus laevis*. Para ello se llevarán a cabo ensayos de expresión en superficie celular, se utilizarán los canales recombinantes GIRK5wt y sus mutantes con el epítopo extracelular Hemaglutinina (HA); la detección y cuantificación de los canales en membrana plasmática se determinará con el anticuerpo monoclonal anti-AH en ausencia y presencia de brefeldina A (BFA), un metabolito fúngico que bloquea el transporte de retículo endoplásmico a Golgi de canales de nueva síntesis, sin efectos sobre la endocitosis mediada por clatrina, y por el tratamiento con primaquina que inhibe selectivamente el reciclamiento en endosomas pero no la endocitosis.

18. Referencias

- Aerni-Flessner** L, Otu M, y Moley K. (2011). The amino acids upstream of NH(2)-terminal dileucine motif play a role in regulating the intracellular sorting of the Class III transporters GLUT8 and GLUT12. *Mol Membr Biol.* 28:30-41.
- Aidley, D.J.** y Stanfield, P.R. (1998). Ion channels molecules in action, Cambridge University Press, U K. pp: 1-79.
- Akasaki K**, Suenobu M, Mukaida M, Michihara A, Wada I.(2010). COOH-terminal isoleucine of lysosome-associated membrane protein-1 is optimal for its efficient targeting to dense secondary lysosomes. *J Biochem.* 148:669-79.
- Alberts, B.**, Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K. & Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4^a. Ed. Garland science. USA. pp: 583-656
- Barish, M.E.** (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 342:309-25.
- Bauer, C.K.**, Falk, T. y Schwarz, J.R. (1996). An endogenous inactivating inward rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 432:812-20.
- Bello, V.**, Goding, J.W., Greengrass, V., Sali, A., Dubljevic, V., Lenoir, C., Trugnan, G., and Maurice, M. (2001). Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3004-3015.
- Berg T.**, Strømhaug P., Løvda T., Seglen P., y Berg T. (1994). Use of glycy-L-phenylalanine-2-naphthylamide, a lysosome-disruptingcathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and
- Bianchi, L.** y Driscoll, M. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes (August 1, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.117.1, <http://www.wormbook.org>.
- Bianchi, L.**, Roy, M.L., Taglialatela, M., Lundgren, D.W., Brown, A.M. y Ficker, E. (1996). Regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL- 1 cells. *J. Biol. Chem.* 271:6114-6121.
- Bichet, D.**, Haass, F.A. y Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 957-67.
- Biggin, P.C.**, Roosild, T. y Choe, S. (2000). Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 456-61.
- Bolsover, S.**, Hyams, J., Shephard E., White, H. y Wiedemann, C. (2004). *Cell Biology: A Short Course*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Bond, C.T.**, Pessia, M., Xia, X.M., Lagrutta, A., Kavanaugh, M.P. y Adelman, J.P. (1994). Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Receptors Channels.* 2:183-91.
- Bonifacino, J. S.**, and Traub, L. M. (2003). Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395-447.
- Choe, S.** (2002). Potassium channel structures. *Nature Rev. Neurosci.* 3:115-121.
- Cohen, N. A.**, Brenman, J. E., Snyder, S. H. y Brecht, D. S. (1996). Binding of the inward rectifier K⁺ channel Kir2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron.* 17:759-767.
- Collins, B.M.**, McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., y Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell.*109:523-535.
- Dascal, N.** (1997) Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell. Signal.* 9:551-73.
- Dietrich, J.**, Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N., y Geisler, C. (1997). Regulation and Function of the CD3γ DXXXLL motif: A binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol.* 138:271-281.
- Doyle, D.A.**, Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. y MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.

- Erlich, H.A.** (1992) PCR technology. WH Freeman and Co. N.Y.
- Flagg, T.P.,** Yoo, D., Sciortino, C.M., Tate, M., Romero, M.F. y Welling, P.A. (2002). Molecular mechanism of a COOH-terminal gating determinant in the ROMK channel revealed by a Bartter's disease mutation. *J. Physiol.* 544:351-362.
- Garrido J,** Fernandes F, Giraud P, Mouret I, Pasqualini E, Fache MP, Jullien F, Dargent B. (2001). Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *EMBO J.* 20:5950-61.
- Garrido J,** Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache M, Debanne D, Dargent B. (2003). A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science.* 300:2091-4.
- Gong, Q.,** Weide, M., Huntsman, C., Xu, Z., Jan, L. Y., y Ma, D. (2007). Identification and Characterization of a New Class of Trafficking Motifs for Controlling Clathrin-independent Internalization and Recycling. *J. Biol. Chem.* 282:13087-13097.
- Guerriero C,** Lai Y, y Weisz O. (2008). Differential sorting and Golgi export requirements for raft-associated and raft-independent apical proteins along the biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 283:18040-7.
- Gurdon J,** Lane C, Woodland H. y Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 233:177-182.
- Gutman, G.,** Chandy, K., Adelman, J., Aiyar, J., Bayliss, D., Clapham, D., Covarriubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M., Grissmer, S., Jan, L., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H., McKinnon, D., Nichols, C., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M., Vandenberg, C., Wei, A., Wulff, H. y Wymore, R. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltagegated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 55:583-6.
- Gutman, G.,** Chandy, K., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L., Robertson, G., Rudy, B., Sanguinetti, M., Stuhmer, W., Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57: 473–508.
- Hagiwara, S. y Yoshida, M.** (1979). Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. *J. Physiol.* 292:251-65.
- Halliwel J, Plant T, Robbins J, Standen NB.** (1994). Voltage clamp techniques. In: *Microelectrode Techniques. The Plymouth Workshop Handbook* (2nd ed.), edited by Ogden D. Cambridge, UK: The Company of Biologists Ltd., p. 17–35.
- Hedin, K.E.,** Lim, N.F., y Clapham, D.E. (1996). Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of I KACH currents in oocytes. *Neuron.* 16:423-29.
- Heilker, J.,** Manning-Krieg, U., Zuber, J. F., y Spiess, M. (1996). In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* 15:2893-2899.
- Hibino H,** Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function and physiological roles. *Physiol Rev* 90:33-5.
- Hille, B.** (2001). Ionic channels of excitable membranes, Sinauer, Sunderland, Mass., USA. Pp: 2-4, 13-18, 131-160.
- Ho Koh, Y.,** von Arnim, C. A. F., Hyman, B. T., Tanzi, R. E., y Tesco, G. (2005). BACE Is Degraded via the Lysosomal Pathway. *J. Biol. Chem.* 280:32499-32504.
- Ho, K.,** Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M. V. y Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature.* 362:31-8.
- Honing, S.,** Sandoval, I. V., y von Figura, K. (1998). A di-leucine- based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* 17:1304-1314.

- Huang, C.L.**, Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1997). Binding of the G protein subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett.* 405:291-8.
- Huang, C.L.**, Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, N.Y. y Jan, L.Y. (1995). Evidence that direct binding of G to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron.* 15:1133-43.
- Hunziker W**, Fumey C. (1994). A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *The EMBO journal.* 13:2963-9.
- Isomoto S**, Kondo C, Takahashi N, Matsumoto S, Yamada M, Takumi T, Horio Y, Kurachi Y. (1996). A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G-protein-gated K⁺ current in Xenopus oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 218:286-91.
- Jelacic TM**, Kennedy ME, Wickman K, Clapham DE. (2000). Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J Biol Chem.* 275:36211-6.
- Jespersen T**, Rasmussen H, Grunnet M, Jensen H, Angelo K, Dupuis D, Vogel L, Jorgensen N, Klaerke D, Olesen S. (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J Cell Sci.* 117:4517-26.
- Johnston, D. y Miao-Sin Wo, S.** (1995). Foundations of Cellular Neurophysiology, Mass., Institute of Technology. pp: 9-53, 121-214.
- Karschin C**, Schreibmayer W, Dascal N, Lester H, Davidson N, Karschin A. (1994). Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel in the rat. *FEBS Lett.* 348:139-44.
- Karschin, C.**, Dissmann, E., Stuhmer, W. y Karschin, A. (1997) IRK(1–3) and GIRK(1–4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 16:3559-70.
- Kennedy M**, Nemeč J, Clapham D. (1996). Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K⁺ channel subunits. *Neuropharmacology.* 35:831-9.
- Kennedy, M.E.**, Nemeč, J., Corey, S., Wickman, K. y Clapham, D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-proteingated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274:2571-82.
- Kinlough, C.L.**, Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L. y Hughey, R.P. (2004). MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J. Biol. Chem.* 279:53071-7.
- Kirchhausen, T.** (2002). Clathrin Adaptors Really Adapt. *Cell.* 109: 413–416.
- Kirchhausen, T.**, Bonifacino, J.S. y Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation-receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 488-495.
- Kobayashi, T.**, Ikeda, K., Ichikawa, T., Abe, S., Togashi, S., y Kumanishi, T. (1995). Molecular cloning of a mouse G protein-activated K⁺ channel (mGirk1) and distinct distributions of three Girk (Girk1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:1166-1173.
- Krapivinsky, G.**, Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. y Clapham, D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺ channel proteins. *Nature.* 374:135-41.
- Krapivinsky, G.**, Medina, I., Eng, L., Krapivinsky, L, Yang, Y. y Clapham, D.E. (1998a). A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron.* 20:995-1005.
- Kubo Y.** (1996). Effects of extracellular cations and mutations in the pore region on the inward rectifier K⁺ channel IRK. *Receptors and Channels.* 4:73-83.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J. Jan, Y. N. y Jan L. Y.** (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier K⁺ channel. *Nature.* 362:127-33.
- Le Borgne, R., y Hoflack, B.** (1998). Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin – coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:499-503.
- Lesage F**, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot JP. (1994). Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G protein-coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Lett;* 353:37-42.

- Letourneur, F., and Klausner, R. D.** (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine- based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*. 69:1143-1157.
- Liao, Y. J., Jan, Y. N. y Jan, L.** (1996). Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in Weaver brain. *J. Neurosci*.16:7137-7150.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudana, P., Baltimore, D., y Darnell, J.** (2004). *Biología Celular y Molecular*. 5ª . ed. Editorial Medica Panamericana. México, D. F. Pp: 701-738.
- Loewi, O.** (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch*. 189:239-42.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. y Nichols, C.G:** (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 372:366-9.
- Lu Z. y MacKinnon R.** (1994a). A conductance maximum observed in an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol*. 104:477-86.
- Lu, L., Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.C. y Guggino, W.B.** (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J*. 57:1117-23.
- Lu, Z.** (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu. Rev. Physiol*. 66:103-29.
- Lüscher C, Xia H, Beattie E, Carroll R, von Zastrow M, Malenka R, Nicoll R.**(1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*. 24:649-58.
- Lüscher C, y Slesinger P.** (2010) Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 11:301-15.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y.** (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*. 291:316-319.
- Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S.R., Jan, Y.N. y Jan LY.** (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron*. 33:715-29.
- MacKinnon, R.** (2003) Potassium channels. *FEBS Lett*. 555:62-5.
- Mark, M.D. y Herlitze, S.** (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem*. 267:5830-6.
- Matsuda, H.** (1991). Effects of external and internal K⁺ ions on magnesium block of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea-pig heart cells. *J. Physiol*. 435:83-99.
- Matsuda, H., Saigusa, A. y Irisawa, H.** (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by Mg²⁺. *Nature*. 325:156-9.
- Maxfield, F. R., y McGraw, T. E.** (2004). *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 5, 121–132
- Mikosch M, Hurst A, Hertel B, Homann U.** (2006). Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiol*. 142:923-30.
- Mikosch M, Käberich K, Homann U.** (2009). ER export of KAT1 is correlated to the number of acidic residues within a triacidic motif. *Traffic*. 10:1481-7.
- Miledi, R., I.** (1982). A calcium dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond*. 215:491-7.
- Miledi, R., Parker, I., y Sumikawa, K.** (1983). Recording of single gamma-amino-butyrate-and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 218:481-484.
- Miranda K, Khromykh T, Christy P, Le T, Gottardi C, Yap A, Stow J, Teasdale R.** (2001). A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*.276:22565-72.
- Mirshahi T., y Logothetis D.** (2002). GIRK channel trafficking: different paths for different family members. *Mol Interv*. 2:289-91.
- Molleman, Areles.** (2003). Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. Jonh Wiley & Sons, LTD. pp: 5-42, 115-139

- Mora, S.I. y Escobar, L.I.** (2005). Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett.* 579:3019-23.
- Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. y Kjekens, R.** (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 377:1-16
- Nakatsu, F. y Ohno, H.,** (2003). Adaptor Protein Complex as the key regulators of protein sorting in the Post-Golgi Network. *Cell Structure and Function.* 28:419-429
- Nebreda A. y Ferby I.** (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 666–675.
- Neer, E.J.** (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80:249-57.
- Nichols, C.G. y Lopatin, A.N.** (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171–91.
- Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, Okazaki Y, Aguilar R, Foelsch H, Mellman I, Saito T, Shirasawa T, Bonifacino J.** (1999). Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* 449:215-20.
- Partiseti, M., Collura, V., Agnel, M., Culouscou, J.M. y Graham, D.** (1998). Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett.* 434:171-6.
- Penden, A., Park, G. y Scheller, R.** (2001). The Di-leucine motif of vesicle-associated membrane protein 4 is required for its localization and AP-1 binding. *J. Biol. Chem.* 276:49183-49187.
- Peña-Münzenmayer G, Catalán M, Cornejo I, Figueroa CD, Melvin JE, Niemeyer MI, Cid LP, Sepúlveda FV.**(2005) Basolateral localization of native ClC-2 chloride channels in absorptive intestinal epithelial cells and basolateral sorting encoded by a CBS-2 domain di-leucine motif. *J Cell Sci.* 118:4243-52.
- Pond, L., Kuhn, L., Teyton, L., Schutze, M.-P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., y Peterson, P.A.** (1995). A role for acidic residues in dileucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 270:19989-19997.
- prelysosomal endocytic vacuoles, *Biochem. J.* 300: 229– 236.
- Rivera J, Ahmad S, Quick M, Liman E, Arnold D.** (2003). An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K⁺ channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci.* 6:243-50.
- Rodionov D, Höning S, Silye A, Kongsvik T, von Figura K, Bakke O.** (2002). Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem.* 277:47436-43.
- Ruppersberg, J.** (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 441:1-11.
- Sadja, R., Alagem, N. y Reuveny, E.** (2003). Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron.* 39:9-12.
- Salvador, C., Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G., and Escobar, L.I.** (2001). Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:135–47.
- Salvador, C., Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. y Escobar LI.** (2003). Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences.* 72:1509–18.
- Sandoval, I. V., y Bakke O.** (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends. Cell. Biol.* 4:292-297.
- Sandoval, I.V., Martinez-Arca, S., Valdeza, J., Palacios, S., y Holman, G.D.** (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP2 and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 275:39874–39885.
- Schoots O, Wilson J, Ethier N, Bigras E, Hebert T, y Van Tol H.** (1999). Co-expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties. *Cell Signal.* 11:871-83.

- Signorini, S.,** Liao, Y.J., Duncan, S.A., Jan, L.Y., y Stoffel, M. (1997). Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:923-927.
- Sim, J.H.,** Yang, D.K., Kim, Y.C., Park, S.J., Kang, T.M., So, I. y Kim, K.W. (2002). ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in guinea pig gastric myocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G137-44.
- Smith, P.** Sellers, L. y Humphrey, P. (2001) Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K⁺ channels in MIN-6 cells. *J. Physiol.* 532:127-42.
- Stockklauser, C. y Klöcker, N.** (2003). Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J. Biol. Chem.* 278:17000-5.
- Stühmer W.** (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes in Rudy B, Iverson L (eds). *Methods in Enzymology. Academic Press.* 207: 318-339.
- Stuhmer, W.** (1998). Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth. Enzymol.*293: 280–318.
- Tanemoto, M.,** Fujita, A., Higashi, K. y Kurachi, Y. (2002). PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron.* 34:387-97.
- Tang, W.,** Qin, C.L. y Yang XC. (1995). Cloning, localization, and functional expression of a human brain inward rectifier potassium channel (hIRK1). *Receptors Channels.* 3:175-83.
- Tarasov, A.,** Dusonchet, J. y Ashcroft, F. (2004). Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes.* 53:S113-22.
- Trowbridge, I. S.,** Collawn, J. F., y Hopkins. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Biol.*9: 129-161.
- Tzounopoulos, T.,** Maylie, J. y Adelman, J.P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 69:904-908.
- van Vliet, C.,** Thomasb, E. C., Merino-Trigoa A., Teasdaleb, R., D., y Gleesona, P. A. (2003). Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology.* 83:1-45.
- Weber, W.-M.** (1999a). Endogenous Ion Channels in oocytes of *Xenopus laevis*: Recent Developments. *J. Membrane Biol.* 170:1-12.
- Weber, W.-M.** (1999b). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta.* 1421:213-233.
- Werner, P.,** Hussy, N., Buell, G., Jones, K. A., y North, R. A. (1996). D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 49:656–61.
- Wettscureck, N. y Offermanns S.** (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific function. *Physiol Rev.* 85:1159-204.
- Wickman, K., y Clapham, D.E.** (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* 75:865–885.
- Yamada, M.,** Inanobe, A. y Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* 50:723-60.
- Yang, J.,** Jan, Y. N y Jan, L. (1995) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron* 14:1047–54.
- Zerangue N,** Schwappach B, Jan Y, Jan L. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 22:537-48.
- Zhang, Q.,** Pacheco, M.. y Doupnik, C.. (2002) Gating properties of GIRK channels activated by Galpha(o)- and Galpha(i)-coupled muscarinic m2 receptors in *Xenopus* oocytes: the role of receptor precoupling in RGS modulation. *J. Physiol.* 545:355-73.
- Zhu, L.** (1997) In vitro site-directed mutagenesis using the unique restriction site elimination (USE) method. *Methods in Mol. Biol.* 57:13-29.
- Zylbergold P.,** Ramakrishnan N, y Terence E (2010). The role of G proteins in assembly and function of Kir3 inwardly rectifying potassium channels. *Channels* 4: 411-421.

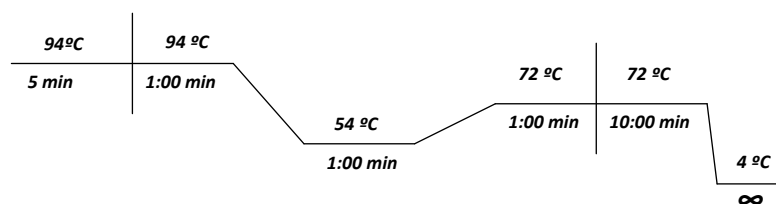
Apéndice A1: Técnicas.

- **Condiciones de amplificación para la PCR.**

Mezcla de reacción

Reactivos	[final]
Buffer de PCR	1x
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM
Iniciador sentido	0.4 mM
Iniciador antisentido	0.4 mM
ADN molde	~ 50 ng
Enzima	3.5 unidades

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



Volumen de reacción: 50 µL

No. de ciclos: 40

- **Condiciones de la reacción de ligación.**

	Control 1	Control 2	Ligación 1:1	Ligación 1:3
H ₂ O <small>Biología molecular</small>	✓	✓	✓	---
Buffer de ligación 10X	---	✓	✓	✓
ATP 10 mM	---	✓	✓	✓
Fragmento	---	---	✓	✓
Vector	✓	✓	✓	✓
Ligasa	✓	✓	✓	✓

--- no se adicionó

✓ Se adicionó

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche.

- **Preparación de células competentes**

1. Incubar 5 mL de medio LB con una colonia bacteriana DH5a, o con 10 ml del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante.
2. Incubar 20 mL de medio LB con 0.2 mL del cultivo bacteriano del paso 1, a 37°C con agitación constante.
3. Checar el crecimiento hasta que alcance una OD de 0.3 a 0.5. (aprox. 3h)
4. Centrifugar a 4000 rpm por 5 min a 4°C en un tubo estéril.

5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 1mL de **solución A** fría. Llevar las células a un volumen final de 10 mL con la solución A y centrifugar como en el paso 4. Decantar el sobrenadante.
6. Resuspender el botón en 1mL de solución B fría. Llevar a un volumen final de 10 mL con la **solución B**.
7. Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células como en el paso 4.
8. Decantar el sobrenadante. Secar el tubo lo más posible.
9. Muy suavemente resuspender las bacterias en 2 mL de **solución B**.
10. Hacer alícuotas de 200 µL y agregar 10% de glicerol estéril. Mezclar por inversión. Congelar estos stocks en hielo seco y almacenar a -70°C.

Solución A	[mM]	Solución B	[mM]
MOPS pH7.0	10	MOPS pH6.5	100
RbCl	10	RbCl	10
		CaCl ₂	50

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

- **Transformación.**

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

- **Medio LB 1X líquido / bacterias.**

Reactivo	Volumen 1000 mL
Bactotripton	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
NaCl.	10 g

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

- **Medio LB 1X sólido para bacterias.**

1. A 1000 mL de LB 1X líquido agregar 15 g de agar.
 2. Colocar en cajas y guardar 4°C.
- Se agrega antibiótico dependiendo la resistencia especificado para el vector específico.

- **Gel Agarosa 1% para ADN**

Agarosa	0.3 g
TBE1X	30 mL
Bromuro de Etidio	1.4 µL

- **Buffer TBE**

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

- **Colorante para corrimiento en gel (ADN).**

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

Guardar a 4 °C.

- **Gel Agarosa ARN**

Agarosa	0.3 g
H ₂ O	30 mL
MOPS 10X	3 mL
Formaldehido	1.5 mL

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

- **MOPS 10X**

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

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

•Método de Lisis Alcalina

- 1.- Incubar a 37 °C toda la noche: 4 mL de medio LB antibiótico y 100 µL de las bacterias transformadas.
- 2.- Centrifugar a 5000 rpm 3.5 mL. El restante se guarda con 50 µL de glicerol estéril.
- 3.- Resuspender el botón en 100 µL de la solución I. Transferir a un eppendorf y dejar 5 min. a temperatura ambiente.
- 4.- Agregar 200 µL de solución II fresca, dejar 5 min. en hielo.
- 5.- Agregar 150 µL de la solución III y dejar 10 min. en hielo.
- 6.- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C por 10 min. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- 7.- Agregar 1/10 volúmenes de tris-Hcl 1M pH8.
- 8.- Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo.
- 9.- Vortex 15 seg.
- 10.-Centrifugar a 14000 rpm 4 °C por min. Recuperar la fase de arriba.

- 11.- Repetir paso 8.
 - 12.- Dejar mínimo 15 min. a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se puede dejar toda la noche.
 - 13.- Centrifugar a 14000 rpm $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por min. Decantar.
 - 14.- Lavar el pellet 1X con Etanol (500 μl al 70 -80%). Centrifugar a 14000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min.
 - 15.- Secar el pellet.
 - 16.- Resuspender el pellet en 40 μL de H_2O o TE.
- Nota: hay que mezclar por inversión los pasos 3,4 y 5**

- **Soluciones**

SOL. I

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA pH8.0	10 mM

Preparar en 100 ml esterilizar 15 min en autoclave. Guardar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

SOL. II

	Concentración final	Stock	2 mL
NaOH	0.2N	10 N	40 μL
SDS	1%	10%	200 μL
		H_2O	1.760 mL

Preparar al momento

SOL.III

Acetato de potasio (5M)	60 mL
Ac. Acético glacial	11.5 mL
H_2O	28.5 mL

El resultado final es 3M de K^+ Y 5M de acetato.
Esta solución se mantiene en hielo.

APENDÍCE A2

Secuencia de los iniciadores mutagénicos sentido (up) y antisentido (low) utilizados.

Mutante	DNA Molde	Iniciador 5'	Iniciador 3' low
GIRK5E17A	GIRK5	E17Aup 5'GATTGTATGCGTCACCAC ^{3'}	E17low 5'GTGGTGACGCATACAATC ^{3'}
GIRK5S18A	GIRK5	S18Aup 5'TTGTATGAGGCGCCACAAC ^{3'}	S18Alow 5'GAGTTGTGGCGCCTCATACAA ^{3'}
GIRK5P19A	GIRK5	P19Aup 5'GTATGAGTCAGCACAACTCATC ^{3'}	P19Alow 5'GATGAGTTGTGCTGACTCATAC ^{3'}
GIRK5Q20A	GIRK5	Q20Aup 5'GAGTCACCAGCGCTCATCCAA ^{3'}	Q20Alow 5'TTGGATGAGCGCTGGTGACTC ^{3'}
GIRK5L21A	GIRK5	L21Aup 3'CACCACAAGCCATCCAAACC ^{3'}	L21Alow 5'GGTTTGCATGGCTTGTGGTG ^{3'}
GIRK5I22A	GIRK5	I22Aup 5'CCACAAC ^{3'} TCGCCCAAACCATC ^{3'}	I22Alow 5'GATGGTTTGGGCGAGTTGTGG ^{3'}
GIRK5L21AI22A	GIRK5	L21AI22Aup 5'GAGTCACCACAAGCCGCCCAAACCATCATCGC ^{3'}	L21AI22Alow 5'GCCATGATGGTTTGGGCGGCTTGTGGTGACTC ^{3'}
GIRK5E17AL21AI22A	GIRK5L21AI22A	E17Aup 5'GATTGTATGCGTCACCAC ^{3'}	E17low 5'GTGGTGACGCATACAATC ^{3'}
GIRK5Y16AI22A	GIRK5I22A	Y16Aup 5'AAAGATTG GCT GAGTCACC ^{3'}	Y16Alow 5'GGTGACTCA GCC AATCTTT ^{3'}
GIRK5I22L	GIRK5	I22Lup 5'CCACAAC ^{3'} TCTCCAAACCATC ^{3'}	I22Llow 5'GATGGTTTGGAGGACTTGTGG ^{3'}