



FACULTAD DE CIENCIAS

**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**PAPEL DEL RESIDUO N264 EN LA CONDUCCIÓN
DE PROTONES A TRAVÉS DEL CANAL HV DE
*CIONA INTESTINALIS***

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

ESTER ALEJANDRA OTÁROLA SOTO

DIRECTOR

CARLOS GONZÁLEZ LEÓN

Valparaíso, Chile

2013

Índice

Introducción	2
1.1 Rol Fisiológico de Hv	2
1.2. Topología y estructura de los canales Hv	3
1.3. Mecanismos de conducción en el canal Hv	5
1.3.1. Un poro acuoso en S4 para la conducción	6
1.3.2. Corrientes omega para explicar conducción en Hv	9
Hipótesis	11
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
Materiales y métodos	11
1. Biología Molecular	13
1.1. Bacterias	13
1.2. Transformación de bacterias	13
1.3. Antibióticos	14

1.4. Obtención del DNA plasmidial	14
1.5. Purificación de DNA plasmidial	15
1.6. Características del clon utilizado	15
1.7. Mutagénesis mediante PCR	16
1.8. Transcripción <i>in vitro</i>	19
1.8.1. Linealización y purificación del DNA	19
1.8.2. Preparación del RNA mensajero	19
2. Animales de experimentación y micro inyección	20
2.1. Obtención de ovocitos	20
2.2. Procedimiento de microinyección	21
3. Electrofisiología	21
3.1. Técnica del <i>patch-clamp</i>	21
3.1.1 Pipetas de registro	23
3.1.3 Soluciones de registro	24
3.1.4 Adquisición de registros	24
3.2. Análisis de las corrientes macroscópicas	25
3.2.1. Relación G/G _{máx} vs V	25

3.2.2. Análisis de Varianza	25
Resultados	27
Determinación de la conductancia unitaria a partir de actividad de canal único	27
Determinación de la conductancia unitaria de Ci-Hv wt con análisis de varianza en estado no estacionario	28
Determinación de la conductancia unitaria de los mutantes N264C, N264Q y N264E para Ci-Hv con análisis de varianza en estado no estacionario	30
Mutación del residuo N264 por cargas positivas reduce o remueve la corriente	34
El mutante N264R es no conductor	36
El residuo N264 formaría una compuerta	38
Discusión	40
Conclusión	42
Referencias	43

Índice de Figuras

Figura 1. Generalidades estructurales de Hv.	4
Figura 2. Corrientes de Hv wt son selectivas a protones e inhibidas por Zn ⁺	6
Figura 3. Vías de conducción de protones a través de Hv	8
Figura 4. Alineamiento del segmento S4 en canales Hv	10
Figura 5: Mapa de restricción de vector pSP64T con el inserto del canal VSOP	16
Figura 6. Método de mutagénesis de <i>Quick change</i>	18
Figura 7. Método de Patch-clamp	22
Figura 8. Esquema del circuito básico de amplificadores del equipo de “Patch-clamp” y del circuito equivalente formado por la pipeta y la membrana	23
Figura 9. Registro de canal único para ci-Hv wt	27
Figura 10. Simulación de un análisis de varianza	28
Figura 11. Análisis de varianza de Ci-Hv wt	29
Figura 12. Corrientes Macroscópicas de Ci-Hv wt, N264Q y N264E.	31
Figura 13. Análisis de varianza de los mutantes N264C, N264Q y N264E de Ci-Hv	32
Figura 14. Registros de corriente de Ci-Hv wt y mutantes de carga positiva	35

Los canales de protones activados por voltaje (Hv) se encuentran en la membrana plasmática y compartimentos celulares de diferentes células de mamíferos, así como en células del músculo liso, esperma y células de la vía respiratoria entre otros. Sin embargo, las primeras corrientes de protones fueron descritas en neuronas de caracol. El canal fue clonado primeramente en células del sistema inmune de humano y ratón. A pesar de que el canal fue clonado en células de mamífero se encuentra también en invertebrados, como en *Ciona intestinalis*, en particular el canal clonado desde este invertebrado ha demostrado una muy buena expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los canales clásicos dependientes de voltaje son estructuras tetraméricas, donde cada monómero consta de seis segmentos transmembrana. Los cuatro primeros corresponden al dominio sensor de voltaje (VSD) y los últimos dos segmentos de las cuatro subunidades conforman el dominio del poro, el cual es la vía de conducción del canal. Por otro lado Hv son estructuras diméricas que tiene una arquitectura en donde se aprecian cuatro segmentos transmembrana (S1-S4), los que presentan una alta homología con el VSD de los canales de K⁺ activados por voltaje (Kv), pero carecen de una estructura definida para la conducción de protones. Debido a que la vía de conducción de protones aun no ha sido definida. En la búsqueda de la posible vía de conducción para los protones, encontramos un residuo en el segmento S4, la asparagina 264 (N264), que podría ser parte esencial en la conducción. Este residuo se encuentra altamente conservado en los canales de protones de diversas especies, sin embargo no está presente en el VSD los canales Kv. Para establecer si la posición N264 es parte del mecanismo de conducción de protones en Hv de *Ciona intestinalis*, realizamos mutaciones puntuales en este residuo y se realizaron experimentos de análisis de varianza en estado no estacionario. Determinamos que la conductancia unitaria de Ci-Hv *wt* fue de ~200 fS. Para las mutaciones mutaciones N264C, N264Q y N264E se produjo un aumento de la conductancia de 300 fS, 2 pS y 6 pS, respectivamente. Cuando el residuo N264 se mutó por aminoácidos básicos, como lisina (N264K) y arginina (N264R) conllevan una disminución o inhibición total de la corriente, respectivamente.

Al analizar el modelo de Ci-VSOP basado en un modelo por homología del sensor de voltaje (VSD) de la quimera Kv1.2-Kv2.1, se observó que la posición N264 se encuentra sobre un bolsillo hidrofílico y rodeado de aminoácido apolares en la parte más angosta de la estructura. Esto, junto con nuestros resultados experimentales, nos lleva a pensar que la posición N264 es la compuerta para el flujo de protones en Hv.