

UCH-FC
DOC = BIEN
G 288
C. 4

**"PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE IP_3 EN
LA INSERCIÓN DE CANALES DE POTASIO TIPO
SHAKER EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE
OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*"**

**Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Silvina Beatriz Gayol Molinari

Agosto, 2008

**Director de Tesis: Dr. David Naranjo Donoso
Co-Directora de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Silvina Beatriz Gayol Molinari

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de agosto del 2008.

Director de Tesis:

Dr. David Naranjo

Co-Directora de Tesis

Dra. Ana María Cárdenas

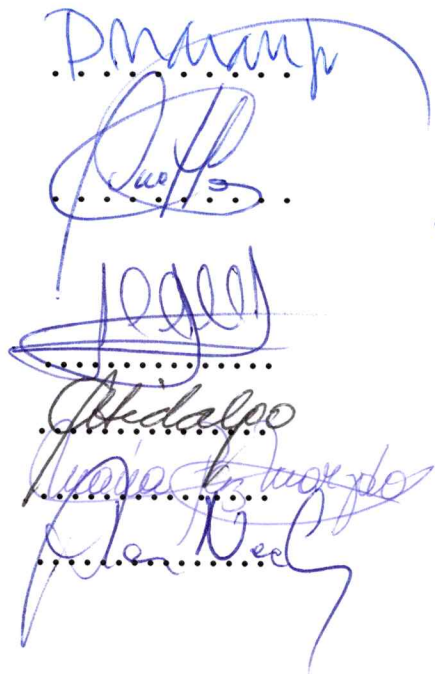
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ariel Orellana (Presidente)

Dra. Cecilia Hidalgo

Dra. María Paz Marzolo

Dr. Alan Neely



A mi familia y amigos, a cada lado de la Cordillera

A mis queridísimos padres

RESUMEN BIOGRÁFICO

Argentina de nacimiento, estudié la Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad de Buenos Aires. Mientras cursaba mi carrera trabajé en el Instituto Leloir junto al Dr. Salas, estudiando moléculas de adhesión intercelular en células MDCK. Posteriormente, con el Dr. Colombo en el Programa Unidad de Neurobiología Aplicada, analizando las células gliales de la corteza cerebral de ratas y primates. Durante estos años realicé dos pasantías: en el laboratorio del Dr. DeFelipe, en España, y del Dr. Reichenbach, en Alemania.



En el año 2000, vine a Chile a realizar un Magíster en Neurociencia y consecutivamente el Doctorado. En este tiempo trabajé en el Centro de Neurociencia de Valparaíso, junto al Dr. Neely y al Dr. Naranjo, estudiando la biofísica de los canales de calcio y el transporte del canal de potasio a la membrana plasmática, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

A través de estas palabras quiero agradecer a todos aquellos que me han acompañado en esta larga y difícil etapa, tan importante para mi vida profesional. Quiero expresar mi más profunda gratitud a todos los que me apoyaron, me enseñaron y sobre todo me soportaron durante este período.

En primer lugar quiero agradecer a los integrantes de la comisión evaluadora, el Dr. Orellana, la Dra. Hidalgo y la Dra. Marzolo, por su tiempo, críticas y recomendaciones en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Bacigalupo y la Dra. Vergara, que como Directores del Programa de Doctorado, siempre estuvieron disponibles para aconsejarme y contestar todas mis inquietudes.

A todo el Centro de Neurociencias de Valparaíso, desde los investigadores principales hasta los auxiliares, principalmente por soportar a “esta argentina”, a veces tan malhumorada, y además por hacer más fácil esta dura experiencia de trabajar y vivir lejos de mi tierra. A mis vecinos, del laboratorio de Neurogenética y Desarrollo, liderados por Kate y John, no solo por hacerme sentir una más del grupo, sino también por hacerme partícipe de todas sus celebraciones.

A todo el grupo del Anillo ACT-46, por sus consejos y apoyo; a Agustín por responder a todas mis consultas de biología celular; a Ana María, no solo por aceptar ser la co-tutora de este proyecto, sino también por su siempre positivo entusiasmo. A mis queridísimos compañeros de laboratorio: a César por mantener a nuestras ranitas siempre limpias y alimentadas; a Vicky, no solo por su apoyo técnico, sino también por su constante preocupación por mi bienestar; a Kathy, por su ayuda técnica y su cariño. A Vivian, Rodrigo, Christian, Pedro y Vane, excelentes

compañeros, les agradezco por su paciencia, su apoyo y amistad incondicional; por ser mi familia profesional y espiritual.

A David y Alan, por darme su voto de confianza para llevar a cabo este proyecto; por contagiarme esa pasión por la ciencia en cada discusión de resultados y estrategias a seguir; por compartir sus experiencias y transmitir todos sus conocimientos. Pero por sobre todo, porque además de ser excelentes científicos son tan buenos “tipos”, como se dice en mi país; porque tuve la suerte de tener como “jefes” a dos personas que no solo se preocuparon de mi formación profesional, sino también de estar atentos a mis bajones anímicos, brindándome siempre una palabra de aliento; gracias por los consejos en los momentos difíciles.

A los Drs. Salas, Colombo y DeFelipe, por haber alentado ese amor por la ciencia en momentos determinantes de mi carrera científica.

A mi familia y amigos del otro lado de la cordillera, Fer, Ceci, Archu, Chiqui, Laura, Vicky, Diego, Pepe, Paco, Víctor, por su afecto y su aliento para continuar en esta dura aventura; por llenarme de mimos y fuerza en cada viaje; por confiar y animarme siempre a seguir adelante.

A mis amigos chilenos, Pancho, Isa, Nacho, Katica, por llenar ese vacío que había quedado en mi corazón al dejar mi país; por estar conmigo en las buenas y en las malas, sobre todo en las malas; por ser mi sostén y fuente de alegrías; siempre, siempre voy a guardar los momentos que vivimos en un lugar muy especial de mi corazón.

A Juan por su amor y comprensión pero, sobre todo, por animarme en mis momentos de debilidad; sin su apoyo constante hubiera sido muy difícil que hubiera llegado hasta aquí. A su familia, por aceptarme como un miembro más y regalarme todo su cariño.

Y finalmente, a quienes me dieron la vida, a mis amados padres; por alentarme siempre a seguir el camino que había elegido; por dejar que su única hija se fuera lejos para seguir su vocación científica; por preocuparse

y apoyarme diariamente a la distancia; porque a pesar de estar tan lejos siempre se los siente tan cerca.

A todos, muchas gracias, por hacer que Chile se convirtiera en mi segundo hogar.....

Silvina

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes Bibliográficos	1
1.1.1 Antecedentes generales	1
1.1.2 Maquinaria molecular de la exocitosis	4
1.1.3 Los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> como modelo de estudio	7
1.1.4 Estructura y glicosilación del canal de K ⁺ <i>Shaker</i>	8
1.1.5 Tráfico de proteínas de membrana a la MP del ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	13
1.2 Hipótesis	18
1.3 Objetivo General	18
1.4 Objetivos Específicos	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Reactivos	19
2.2 Biología Molecular	19
2.3 Generación de mutantes	20
2.4 Expresión de los canales de K⁺ en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	21
2.5 Electrofisiología	21
2.6 Cuantificación de IP₃	22
2.7 Determinación de niveles de expresión del canal	23

2.8 Determinación de expresión del canal en MP del ovocito	24
2.9 Fraccionamiento subcelular	25
2.10 Electroforesis y Western Blot	25
3. RESULTADOS	27
3.1 El Ca^{2+}, proveniente del RE a través de los IP_3R, participa en la inserción de canales de K^+ a la MP	27
3.1.1 Aumento del número de canales funcionales en la MP del ovocito	27
3.1.2 Rol del IP_3R en el reclutamiento de los canales de K^+	30
3.1.3 Cuantificación de los niveles de IP_3	37
3.1.4 Efecto de las variaciones de IP_3 en la inserción de los canales	41
3.2 Identificación del compartimiento subcelular en el cual los canales de K^+ se acumulan durante la incubación a 4°C	46
3.2.1 Comparación de los niveles de corriente iniciales	46
3.2.2 Identificación de las especies del canal	48
3.2.3 Maduración del canal	55
3.2.4 Efecto de la Brefeldina	61
3.2.5 Identificación de las especies del canal en los diferentes compartimientos subcelulares.	66

4. DISCUSIÓN	69
5. CONCLUSIONES	82
6. BIBLIOGRAFÍA	83
7. ANEXOS	89
7.1 Anexo I: Aumento del número de canales funcionales en la MP del ovocito	89
7.2 Anexo II: El aumento de la corriente resulta del reclutamiento de nuevos canales en la MP	92
7.3 Anexo III: La inserción de canales en ovocitos previamente sometidos al protocolo de enfriamiento no es afectada ni por cicloheximida ni por la brefeldina	95
7.4 Anexo IV: Efecto del Ca^{2+} extracelular	99
7.5 Anexo V: La incorporación de canales <i>Shaker</i> a la MP depende de una señal intracelular de Ca^{2+}	101
7.6 Anexo VI: Efecto Tapsigargina y Heparina	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	39
Valores de concentración de IP_3 en ovocitos arrestados (PI4) y ovocitos no arrestados (PI17)	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Transporte de proteínas a la membrana plasmática	3
Figura 2 Modelo para la formación del complejo SNARE durante la exocitosis regulada	6
Figura 3 Canal de potasio tipo <i>Shaker</i>	9
Figura 4 Antecedentes sobre la glicosilación del canal tipo <i>Shaker</i>	11
Figura 5 Esquema de la adición del epítipo HA en el amino terminal del canal	28
Figura 6 La adición del epítipo HA no interfiere con el fenómeno de tráfico	29
Figura 7 Esquema de acción de los compuestos utilizados para bloquear el IP ₃ R	31
Figura 8 Efecto del IP ₃ R en el transporte del canal a la MP I	33
Figura 9 Efecto del IP ₃ R en el transporte del canal a la MP II	36
Figura 10 Efecto de la inyección de IP ₃ en el transporte del canal a la MP	41
Figura 11 Esquema del sitio de acción del U-73122	42
Figura 12 Efecto de la inhibición de la PLC en el transporte del canal a la MP	43

Figura 13	47
Inyecciones de IP3 no revierten el efecto de la inhibición de la PLC en el transporte del canal a la MP	
Figura 14	49
Comparación de los niveles de corrientes iniciales	
Figura 15	51
Formas del canal	
Figura 16	54
Formas del canal presentes en la MP	
Figura 17	56
Aparición de la forma madura del canal en el tiempo	
Figura 18	59
Curva temporal control	
Figura 19	63
Efecto de la Brefeldina	
Figura 20	65
Efecto de la Brefeldina sobre las corrientes	
Figura 21	67
Formas del canal presentes en los diferentes organelos subcelulares	
Figura 22	79
Modelo propuesto para el transporte de los canales de K ⁺ tipo <i>Shaker</i> a la MP	
Figura 23- Anexo I	91
En ovocitos arrestados, la corriente de K ⁺ aumenta de 3 a 20 veces de su valor inicial durante la primera hora de registro	
Figura 24- Anexo II	94
El incremento de la corriente iónica se debe a la inserción de nuevos canales a la MP	

Figura 25- Anexo III	97
El aumento de la corriente es independiente de la síntesis proteica	
Figura 26- Anexo III	98
El aumento de la corriente representa etapas tardías del proceso de inserción	
Figura 27- Anexo IV	100
La inserción de canales es independiente del Ca^{2+} extracelular	
Figura 28- Anexo V	102
El Ca^{2+} intracelular que participa en la inserción es localizado	
Figura 29- Anexo VI	104
El Ca^{2+} involucrado proviene de almacenes intracelulares sensibles a IP_3 y tapsigargina	

ABREVIATURAS

2-APB: 2-aminoetoxidifenil borato

APROX.: aproximadamente

ARF: Factor de ADP-ribosilación

Asn/N: asparragina

ATP: adenosin trifosfato

BAPTA: 1,2-bis (O-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 4 Na

BAPTA-AM: 1,2-bis (O-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetra (acetoxymethyl) ester

Bref: brefeldina

Ca²⁺: calcio

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CHX: cicloheximida

cRNA: ácido ribonucleico copia

DAG: diacilglicerol

DTT: ditiotreitol

EGTA: ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraaceticetoxymethyl ester

Endo H: endoglicosilasa H

GTP: guanosin trifosfato

HA: hemoaglutinina

$^3\text{H-IP}_3$: inositol 1,4, 5 trifosfato tritiado

HRP: peroxidasa de rábano

I: corriente iónica

I_{max} : corriente máxima

I_0 : corriente iónica inicial

IP_2 : inositol difosfato

IP_3 : inositol 1,4,5 trifosfato

IP_3R : receptor de IP_3

IP_4 : inositol tetrakisfosfato

K^+ : potasio

ME: microscopia electrónica

MP: Membrana Plasmática

MTSET: metano triosulfonato de etil-trietilamina

NSF: Factor Soluble a la N-etilmaleimida

ON: OverNight

P3I-kinase: inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinasa

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PI3-kinase: fosfoinositol quinasa

PI17: protocolo de incubación a 17°C

PI4: protocolo de incubación a 4°C

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

PLC: fosfolipasa C

Q: glutamina

RE: Retículo Endoplásmico

RNA: ácido ribonucleico

SERCA: Ca²⁺ ATPasa del retículo sarcoplasmático

SN: sobrenadante

SNAP-25: proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa

SNARE: receptor que une NSF soluble (soluble NSF attachment receptor)

TBS: Tris-Buffer Saline

TEVC: Two-Electrode Voltage-Clamp (Control de Voltaje con Dos Electrodo)

TGN: Trans Golgi Network (Red Trans Golgi)

TIRF: Reflexión Total Interna Fluorescente

VAMP: proteína de membrana asociada a la vesícula (vesicle-associated membrane protein)

VSV: Virus de la estomatitis vesicular.

Cantidades y símbolo de las unidades de medida

Volumen	litro	nl, μ l
Tiempo	hora	h, min, s
Concentración	mol/l	mM, μ M, nM, %(p/v), %(p/p)
Masa molecular	dalton	kDa
Temperatura	grados Celsius	$^{\circ}$ C
Corriente eléctrica	amperio	mA, μ A, nA
Resistencia eléctrica	Ohm	Ω

RESUMEN

Desde su sitio de síntesis, en los ribosomas, hasta su lugar de destino, en la membrana, las proteínas de la membrana plasmática (MP) son transportadas en vesículas que atraviesan varias y complejas estructuras membranosas intracelulares. Estas proteínas se insertan a la MP por un mecanismo denominado genéricamente exocitosis constitutiva. Si bien la exocitosis constitutiva opera en todas las células eucariotas, el desconocimiento de un factor desencadenante que la active, como en la exocitosis regulada, hace difícil abordar su estudio.

Hemos desarrollado una estrategia electrofisiológica para medir en tiempo real la incorporación a la MP de los ovocitos de *Xenopus laevis* de proteínas de membrana expresadas heterológamente. En esta técnica se aprovecha la gran actividad específica de los canales de potasio (K^+) activados por voltaje del tipo *Shaker* y se mide el aumento de la corriente iónica para monitorear la incorporación de nuevos canales a la MP. Luego de inyectar ovocitos de *Xenopus* con cRNA que codifica para el canal *Shaker* disminuimos la temperatura de incubación a 4°C (13°C por debajo de la temperatura normal de incubación). Este arresto por temperatura induce una interrupción de la expresión

superficial de los canales *Shaker*. Al retornar a temperatura ambiente (20°C), la actividad superficial de canales crece 3-20 veces en el curso de una hora. Este crecimiento fue insensible a inhibidores de la síntesis proteica y a bloqueadores de tráfico vectorial desde el RE al Aparato de Golgi, sugiriendo que este aumento de corriente representa etapas tardías del tráfico de proteínas a la MP. La inserción de canales a la MP fue insensible a calcio (Ca^{2+}) extracelular, pero sensible a Ca^{2+} intracelular, de manera que indica que es producido por una señal espacial y temporalmente localizada. Tratamientos con Tapsigargina e inyecciones de Heparina detuvieron la inserción de los canales en la MP, sugiriendo que la fuente de Ca^{2+} es mediada por receptores de IP_3 (IP_3R), localizados en el Retículo Endoplasmático (RE). En este trabajo quisimos: a) demostrar que los IP_3R presentes en el RE participan en la inserción de los canales posterior a su arresto y b) identificar el compartimiento intracelular donde los canales de K^+ quedan arrestados.

La inhibición de IP_3R con un anticuerpo específico o con un antagonista, reducen el tráfico a la MP, sugiriendo que los IP_3R están involucrados en este proceso. La inhibición de la síntesis de IP_3 detuvo el tráfico de los canales, sin embargo, la inyección de este mensajero secundario no intensificó el transporte, indicando que los IP_3R estarían máximamente activos a concentraciones basales de IP_3 .

Los análisis de Western blot a partir de muestras de membranas totales como de MP purificada de ovocitos no arrestados indicaron la presencia de las formas inmadura (con glicosilación rica en manosas adquirida en el RE) y madura (con las cadenas de azúcares modificadas en el Golgi). Sorprendentemente, en los ovocitos arrestados encontramos mayoritariamente la forma inmadura del canal en ambos tipos de fracciones. Estos resultados indican que el tráfico de esta proteína puede ocurrir independientemente de la glicosilación en el Golgi. En concordancia con estos resultados, en el fraccionamiento subcelular aparecen bandas de la especie inmadura en todas las fracciones.

Estos antecedentes nos permiten postular que durante el arresto por temperatura, los canales quedan retenidos en su tráfico a la MP. Una vez terminado el protocolo de enfriamiento, podemos postular dos modelos: a) los canales transitan desde el RE, donde recibieron su primera etapa de glicosilación, hacia la MP saltándose el paso por el Aparato de Golgi o b) los canales, acumulados durante el arresto en la cercanía de la MP, posiblemente el Red Trans Golgi (Trans Golgi network = TGN), comienzan a llegar a la MP. Los canales se transportan atravesando el RE, donde reciben su primera etapa de glicosilación y posteriormente pasan a través del Aparato de Golgi sin sufrir modificación en sus azúcares.

Este proceso es regulado por el Ca^{2+} proveniente desde el RE a través del IP_3R , a los niveles basales de IP_3 presentes en el ovocito.

ABSTRACT

Plasma membrane proteins are transported in membrane vesicles that traverse several complex compartments beginning at their site of synthesis, the ribosomes, to their final destination. This type of protein reaches the plasma membrane (PM) by a mechanism commonly named "constitutive exocytosis". While constitutive exocytosis operates in all eukaryotic cells, ignorance of a trigger that activates it, as in the regulated exocytosis, makes this study hard to assess.

We have developed an experimental strategy to measure, in real time, delivery of a heterologous expressed membrane protein to the PM of *Xenopus laevis* oocytes. We took advantage of the voltage gated *Shaker* potassium (K^+) channels high specific activity to measure protein delivery to the PM as an increase in the ionic current. We injected *Shaker* coding cRNA into the *Xenopus* oocyte and 6 hours later, they were incubated at 4°C for 12 hrs (13°C below the usual incubation temperature). This temperature induced an interruption of surface expression in the *Shaker* K^+ channels. Upon returning the oocytes to room temperature (20°C), within one hour ion channel surface activity increases by 3-20 fold. This increment was insensitive to proteins synthesis inhibitors or blockers of the vectorial membrane traffic from

ER to Golgi apparatus, which might correspond to the late stages in the protein traffic to the PM. This insertion of ion channels to the PM was unaffected by the removal of external Ca^{2+} ions, but was sensitive to internal Ca^{2+} in a manner consistent with the idea that this process results from a temporally and spatially localized Ca^{2+} signal. Tapsigargin and Heparin injections blocked channel insertion to the PM, suggesting that the source of Ca^{2+} was mediated by IP_3 receptors (IP_3R) localized in the ER compartment.

In this work we aimed to: a) demonstrate that the IP_3R in the ER regulates the constitutive insertion of K^+ channels to the PM in *Xenopus* oocytes, and b) identify the subcellular compartment where the K^+ channels remains retained upon temperature arrest.

Specific inhibition of the IP_3R with an antibody or with an antagonist, blocks the traffic to the PM, suggesting that IP_3R are functionally involved in the process. Protein insertion to the PM is abolished by inhibitors of the IP_3 synthesis; however, the injection of IP_3 did not increase the traffic, indicating that IP_3R are maximally active in resting conditions.

Western blot analysis from total membrane and purified PM samples from control oocytes showed the presence of two glycosylated

forms of the channel protein; the immature form (with mannose rich glycosylation acquired in the ER) and the mature form (with sugar chains modified in the Golgi). Unexpectedly, in the temperature arrested oocytes we found mainly the immature form of the channel protein in both types of membrane samples. These results indicate that membrane protein traffic can take place independently of Golgi-linked glycosylation. In agreement with such results, all subcellular fractions of a continuous sucrose gradient showed the presence of the immature form.

These results allow us to postulate that during the temperature arrest, the channels are retained in their traffic to the MP. Based in the cooling protocol, we can postulate two models: a) channels pass from the ER, where they received their first stage of glycosylation, to the MP bypassing the passage through the Golgi apparatus b) channels, accumulated during arrest in the vicinity of the MP (possibly the TGN) begin to reach the MP. The channels are transported through the ER, where they receive their first stage of glycosylation and then pass through the Golgi apparatus without any modification in their sugars. This process is regulated by the Ca^{2+} coming from the ER through IP_3R , at baseline IP_3 concentration present in the oocyte.

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1.1 Antecedentes generales

El tráfico intracelular de proteínas de membrana, tales como los canales iónicos, es complejo. Las proteínas son transportadas en vesículas especializadas desde su sitio de síntesis en los ribosomas hasta su destino final en la membrana plasmática (MP). Los canales son sintetizados en las rugosidades del retículo endoplasmático (RE), donde son simultáneamente ensamblados y procesados apropiadamente, para que, posterior a su paso por el Aparato de Golgi, sean transportados y orientados en la MP o a subdominios de esta donde ellos funcionan (Garland, 1998; Palade, 1975). En todo este proceso están implicadas proteínas residentes del RE, tales como chaperonas y glicosilasas, los microtúbulos y sus motores asociados, vesículas de transporte y componentes del Aparato de Golgi, el citoesqueleto de actina, miosinas, proteínas de anclaje y otras (Steele y col., 2007). La zona más externa del Aparato de Golgi, conocida como Red Trans Golgi (TGN= Trans Golgi Network), es la principal estación de distribución de las proteínas: desde allí emergen diferentes rutas constitutivas y reguladas que reparten

proteínas tanto a la superficie celular como a los compartimentos endosomales (encargados del reciclaje de membrana y proteínas) (Mellman y Warren, 2000) (Figura 1).

Es generalmente aceptado que la exocitosis constitutiva utiliza un mecanismo similar a la regulada: comparten algunos componentes bioquímicos, incluyendo las proteínas SNAP (Proteína que une al Factor Soluble Sensible a N-etimaleimida (NSF)) y SNAREs (Receptor para los SNAPS). En la exocitosis regulada la fusión de vesículas a la MP es gatillada por la entrada de calcio (Ca^{2+}) a través de canales de Ca^{2+} que colocalizan con la maquinaria exocitótica mientras, que en la exocitosis constitutiva la identidad y localización de las señales que gatillan el proceso es imprecisa (Schmoranzler y col., 2000; Ponnambalam, 2003). Experimentos utilizando la técnica de microscopía de onda evanescente no han podido determinar la existencia de sincronización espacio-temporal en eventos de exocitosis constitutiva, indicando ausencia de una coordinación central mediada por algún factor difusible que determine el instante del evento final de fusión. Sin embargo, existe la posibilidad que estos factores puedan actuar en procesos anteriores como el anclaje de vesículas. Estos resultados sugieren que, si se produce una señal de calcio difusible, ésta es demasiado débil o se disipa demasiado rápido

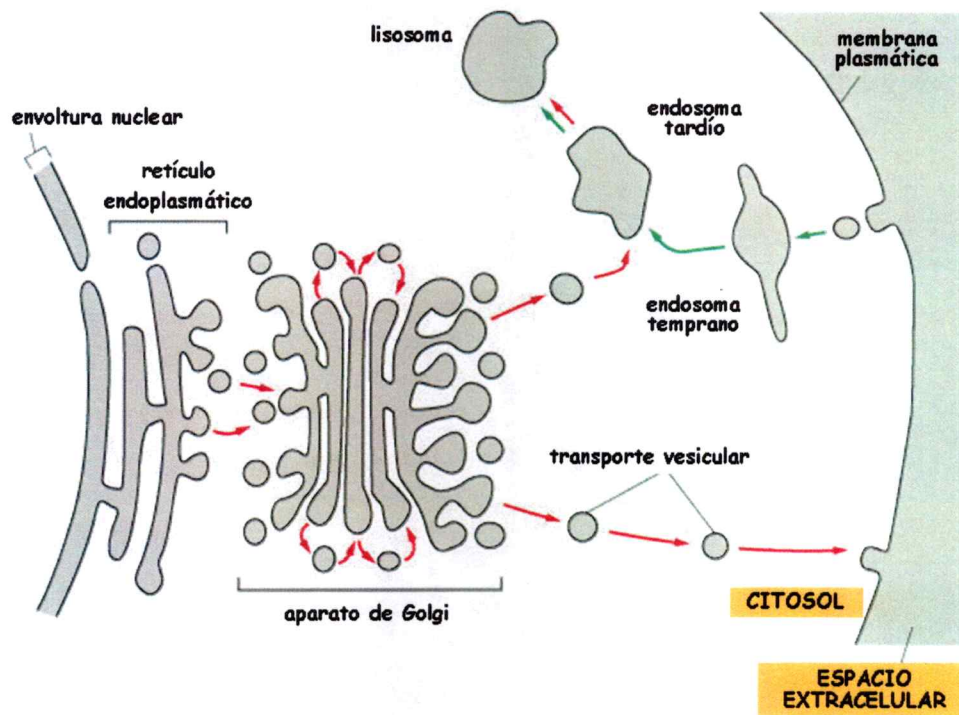


Figura 1. Transporte de proteínas a la membrana plasmática. En el esquema se muestran los compartimentos intracelulares involucrados en el tráfico vesicular en las células eucariotas. Las flechas rojas muestran la vía exocítica y las flechas verdes la vía endocítica (modificado de Alberts y col., 1998).

como para coordinar la fusión simultánea de vesículas en sitios espacialmente cercanos (Sebastian y col., 2006).

1.1.2 Maquinaria molecular de la exocitosis

Durante muchos años, la mayoría de la atención ha estado centrada en la exocitosis regulada clásicamente asociada a mecanismos de liberación de neurotransmisores y neurosecreción. Por otra parte, los mecanismos generales propuestos para la exocitosis se han originado a partir del estudio de la neurosecreción teniendo como marco referencial los mecanismos de secreción de la levadura (Wickner, 2000). Los eventos de fusión de membrana intracelular requieren el ensamblaje de complejos SNARE, los cuales están compuestos de proteínas ancladas a cada una de las membranas que se van a fusionar (Rothman, 1994). En el caso de las neuronas, el complejo SNARE está constituido por la proteína de vesícula (o v-SNARE) **sinaptobrevina** (o VAMP proteína de membrana asociada a vesícula) y las proteínas de MP (t-SNARE) **sintaxina** y **SNAP-25** (proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma). La **sintaxina** está unida a la proteína nSec1 (o Munc 18), antes de la formación del complejo central. En algunos casos, las proteínas Rab facilitarían la disociación de nSec1 de la **sintaxina**, permitiendo la asociación de las 3 SNAREs neuronales: **sintaxina**, **SNAP-25** y **VAMP**

(Chen y Scheller, 2001). En otros casos, basta la unión de syntaxina a nSec1 para facilitar la fusión (Dulubova y col, 2003; Hu y col, 2007).

El Ca^{2+} gatilla el cierre total del complejo, el cual resulta en la fusión de membrana y liberación del contenido vesicular. Luego de este evento de fusión, el reclutamiento de α -SNAP y NSF desde el citoplasma, y la subsiguiente hidrólisis de ATP por NSF causan la disociación del complejo SNARE. Syntaxina, VAMP y SNAP-25 quedan libres para otro ciclo de exocitosis (Figura 2).

La presencia de Ca^{2+} parece ser un requerimiento general para todos los eventos de fusión de membrana intracelular (Mayer, 2001). Una familia de proteínas ancladas a través de su N-terminal a la membrana de vesículas sinápticas, las sinaptotagminas, son los principales candidatos como detector de Ca^{2+} en los procesos de exocitosis dependientes de Ca^{2+} (Fernández-Chacón y col., 2001; Sun y col., 2007). La reacción del Ca^{2+} con la sinaptotagmina incrementa la afinidad de unión a las t-SNAREs resultando en la formación de un intermediario de hemifusión (Chapman, 2002). En levaduras, las cuales aparentemente carecen de sinaptotagminas, el detector de Ca^{2+} podría ser la **calmodulina** (Mayer, 2001).

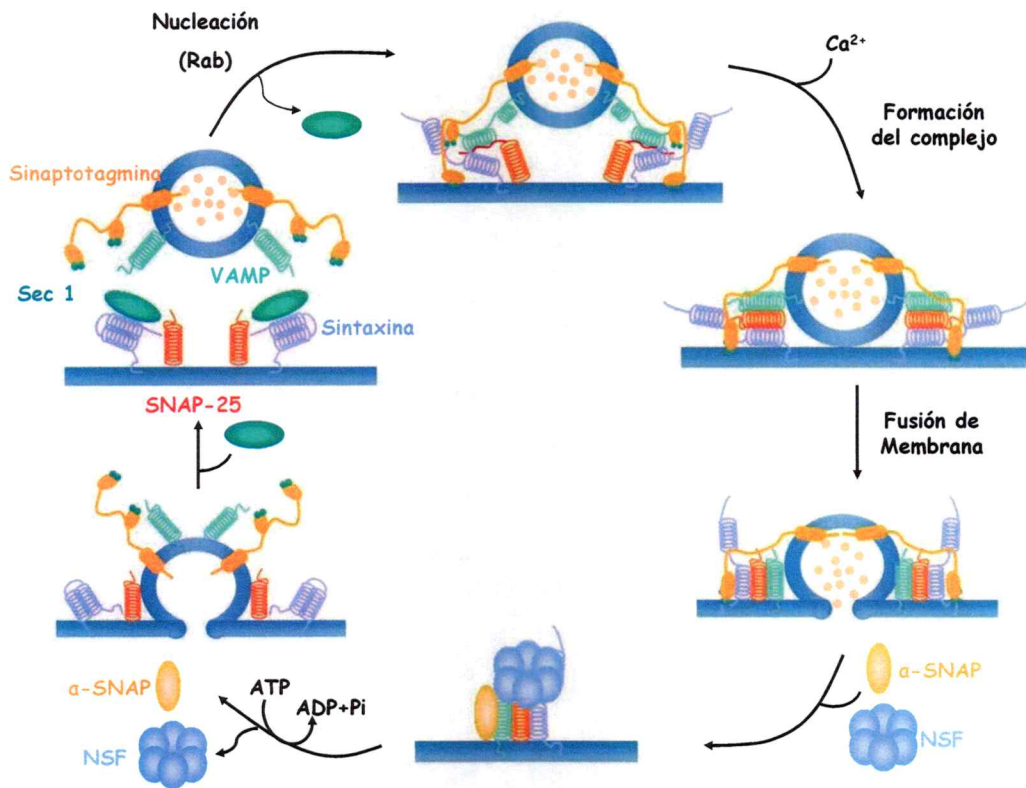


Figura 2. Modelo para la formación del complejo SNARE durante la exocitosis. Descripción en el texto principal (modificado de Chen y Scheller 2001).

1.1.3 Los ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo de estudio.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* se han usado, por muchos años, como sistema de expresión heteróloga de proteínas recombinantes. Los ovocitos inmaduros en el estado VI se encuentran bajo un régimen de arresto fisiológico en la primera profase meiótica (Masui y Markert, 1971). Una señal de progesterona desde las células foliculares les permite continuar con la maduración. Esta propiedad los convierte en un sistema de expresión muy popular. Con muy pocas excepciones, los niveles de expresión heteróloga son mucho mayores de los de las proteínas endógenas. A diferencia de la mayoría de los sistemas de transfección y virales, la cantidad de ácidos nucleicos a inyectar se puede cuantificar con precisión. En el caso de los canales de potasio (K^+) tipo *Shaker*, el nivel de expresión se relaciona linealmente, con intervalos de tres órdenes de magnitud, con respecto a la cantidad de cRNA inyectado (Naranjo, 1997). Gracias a su tamaño (~1 mm de diámetro), es posible inyectar drogas directamente en el citoplasma y/o separar manualmente organelos mediante disección convencional. A pesar de ser uno de los sistemas mas utilizados para la expresión de proteínas de membrana, los mecanismos que gobiernan el transporte de estas proteínas a la MP no han sido definidos.

1.1.4 Estructura y glicosilación del canal de potasio Shaker.

Los canales del K^+ son expresados por la mayoría de las células y desempeñan papeles importantes en fisiología de la misma, incluyendo fijar el potencial de reposo de la membrana y repolarizando y/o modulando el potencial de acción en tejidos excitables (Hille, 1992). El canal de K^+ tipo *Shaker* pertenece a la familia de los canales de K^+ voltaje dependientes presente en el sistema nervioso de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Pongs y col., 1988; Papazian y col., 1988). El canal *Shaker* es un homotetrámero (MacKinnon, 1991), en el cual cada monómero posee 6 segmentos transmembranales (S1-S6), donde el segmento S4 contiene una serie de aminoácidos cargados positivamente los cuales son esenciales para detectar cambios en el campo eléctrico a través de la membrana (sensor de voltaje). Por otra parte, el lazo entre los segmentos S5 y S6 conforman el poro del canal (Figura 3), el sitio de catálisis del transporte de K^+ a través de la membrana.

La secuencia proteica del *Shaker* contiene 4 potenciales sitios de N-glicosilación. Un sitio (N-102) ubicado en la región amino terminal, otros dos (N-259 y N-263) en un lazo entre S1 y S2 y otro (N-625) en la

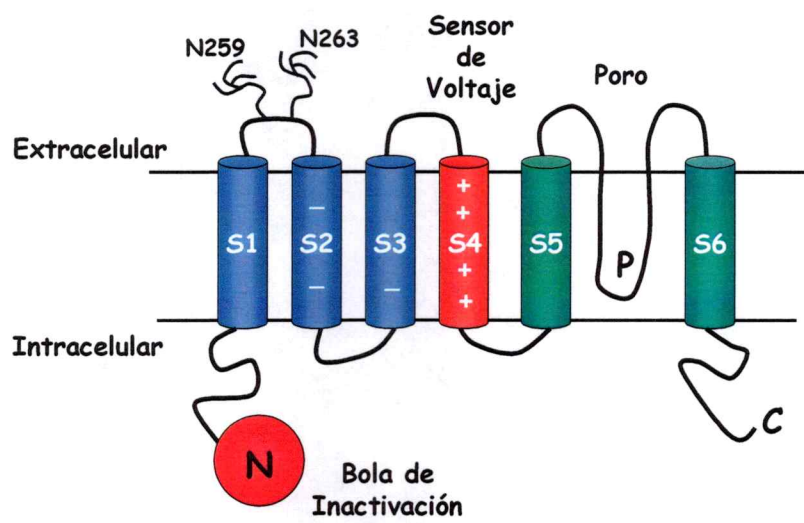


Figura 3. *Canal de potasio tipo Shaker.* Esquema de una subunidad formadora del tetrámero

región carboxilo terminal. Probablemente tanto el primer como el último sitio no son glicosilados, pues están expuestos hacia el lado citosólico de la proteína.

La glicosilación de la proteína *Shaker* en ovocitos de *Xenopus laevis* se ha caracterizado en gran detalle. Esta proteína es glicosilada en dos de los cuatro sitios potenciales. Las modificaciones ocurren solo en las asparraginas 259 y 263, consistente con una localización extracelular (Santacruz-Tolozá y col., 1994). La glicosilación ocurre en dos etapas, la primera es la adición en el RE de carbohidratos ricos en manosa, resultando en una forma inmadura de aproximadamente (aprox.) 73 kDa, y la segunda etapa es la adición de una compleja arborización de oligosacáridos en el Golgi que resulta en una forma madura de aprox. 113 kDa. Ambas contienen N-carbohidratos ya que el tratamiento con N-glicosidasa F, que remueve los carbohidratos N-unidos de las proteínas, las convierte en una forma de aprox. 68 kDa (la masa molecular deducida por secuencia aminoacídica es de 69 kDa) (Santacruz-Tolozá y col., 1994) (Figura 4 A).

A las 24 hs después de la inyección del RNA, se observa la forma de 73 kDa, la cual empieza a disminuir a las 48 hs y no es detectable a las

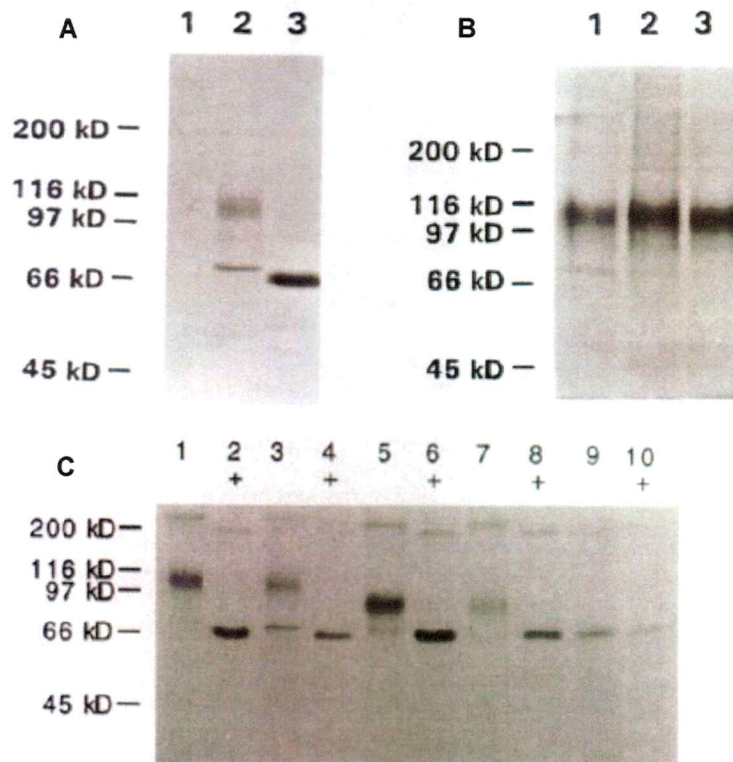


Figura 4. Antecedentes sobre la glicosilación del canal tipo *Shaker*. Los ovocitos fueron metabólicamente marcados con una mezcla de [35 S] metionina y [35 S] cisteína. Las proteínas *Shaker* fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo contra una proteína de fusión *Shaker*- β galactosidasa. En A se muestran las formas de glicosilación presentes en los ovocitos. Línea 1, ovocitos inyectados con agua. Línea 2, ovocitos inyectados con el RNA que codifica para la proteína *Shaker*. Línea 3, la misma muestra que la línea 1 pero tratada con N-glicosidasa F. En B se muestran las formas de glicosilación presentes en los ovocitos a diferentes tiempos luego de la inyección del RNA. Línea 1, 24 hs luego de la inyección. Línea 2, 48 hs luego de la inyección. Línea 3, 72 hs luego de la inyección. En C se muestran el análisis bioquímico de las mutantes de glicosilación en ovocitos. Las líneas marcadas con (+) fueron deglicosiladas con N-glicosilasa F. Línea 1 y 2, *Shaker*. Línea 3 y 4, mutante en un sitio que no corresponde a los sitios de glicosilación (N102Q). Línea 5 y 6, mutante de glicosilación N259Q. Línea 7 y 8, mutante de glicosilación N263Q. Línea 9 y 10, doble mutante de glicosilación N259QN263Q. (Santacruz-Tolozá y col., 1994)

72 hs (Figura 4 B). Esta forma puede ser un precursor de la proteína madura o puede ser una forma inestable de la proteína destinada a degradación (Santacruz-Tolozá y col., 1994). Las mutaciones individuales a N259Q o N263Q por separado reducen la masa molecular de la proteína a aprox. 86 kDa, un valor intermedio entre la forma madura e inmadura. Luego del tratamiento con N-glicosidasa F, los productos proteicos de las mutantes fueron convertidos a una forma con una masa molecular de aprox. 68 kDa (Santacruz-Tolozá y col., 1994). La doble mutante de glicosilación produce una proteína de aprox. 68 kDa que no contiene N-oligosacáridos y su migración no es alterada por el tratamiento con N-glicosidasa F. Así, estos dos sitios parecen dar cuenta de todos los N-carbohidratos de la proteína (Figura 4 C).

Antecedentes en la literatura manifiestan que la eliminación de glicosilación de cada uno o ambos sitios del lazo S1-S2 no imposibilita la expresión de canales activos sobre la superficie celular, indicando que la glicosilación no es necesaria para el apropiado plegamiento de las subunidades, el ensamblaje de los canales, o su transporte a la membrana plasmática (Santacruz-Tolozá y col., 1994).

Si consideramos el peso molecular de los azúcares adicionados en el RE, la proteína debería sufrir un aumento de entre 4 y 5 kDa, lo que es

congruente con el peso de la forma inmadura. Luego de su paso por el Golgi, al canal se le debería adicionar casi 6 kDa de azúcares. Sin embargo, en ovocitos, la glicosilación completa incrementa en aprox. 40 kDa la masa molecular aparente de la proteína *Shaker*. Este incremento puede ser debido, en parte a la adición de carbohidratos y, en parte, a la alteración de las propiedades hidrodinámicas del polipéptido desnaturalizado (Santacruz-Tolosa y col., 1994).

1.1.5 Tráfico de proteínas de membrana a la membrana plasmática del ovocito de *Xenopus laevis*.

La exocitosis constitutiva es importante en el arribo de proteínas a la superficie celular, no solo para el reciclado de los componentes de la MP sino que también para la llegada de moléculas implicadas en numerosos procesos celulares (adhesión, migración, diferenciación). Dado que la mayoría de las proteínas secretadas constitutivamente no requieren de un estímulo específico u obvio para su arribo a la MP, el estudio de este fenómeno es bastante complejo. Se han realizado muchos ensayos para monitorear la llegada constitutiva en tiempo real de vesículas a la MP. Utilizando microscopía de fluorescencia de onda evanescente, también llamada de reflexión total interna (TIRF), además de epi-fluorescencia convencional, se ha podido monitorear el

movimiento de vesículas de transporte individuales, su tamaño y se ha realizado un análisis espacio-temporal de este tráfico (Toomre y col., 2000; Sebastian, 2006). Estas técnicas permitieron monitorear el tráfico desde el Aparato de Golgi a la superficie celular y determinar que 1) existe una circulación local restringida de las vesículas de transporte cerca de la membrana antes de la fusión; 2) un aparente anclaje cerca de la superficie celular y 3) heterogeneidad en el tamaño de las vesículas de transporte. A su vez no se ha podido determinar la existencia de una sincronización espacio-temporal en los eventos de fusión. A pesar de estos hallazgos, todavía hay muchas interrogantes sin responder. De allí la importancia de buscar estrategias experimentales que nos permitan determinar la llegada de las proteínas a su destino y estudiar que factores regulan su tráfico a la MP.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado una estrategia electrofisiológica para medir en tiempo real la incorporación de proteínas de membrana a la MP, utilizando los canales de K^+ dependientes de voltaje tipo *Shaker* como reporteros. Con técnicas electrofisiológicas, observamos como se reclutan nuevos canales a la membrana, correspondiendo probablemente a la fase final del tráfico de proteínas a la MP de *Xenopus laevis* (Torres-Salazar y col., 2002). Esta estrategia consiste en incubar a 17°C por 6 horas a los ovocitos recién inyectados

con el cRNA de *Shaker*, para obtener cierto nivel de expresión del canal, y luego incubar a 4°C por 15 a 24 horas (Protocolo de incubación a 4°C (PI4)). Esta incubación a 4°C, induce un “arresto” de la expresión superficial de los canales de K⁺, de manera análoga al efecto de la incubación a 20°C de células de mamífero (Matlin y Simons, 1983; Andreose y col., 1996).

Esta metodología nos ha permitido hacer observaciones novedosas que se resumen en la siguiente lista (datos correspondientes a la Tesis de Magister de Delany Torres-Salazar- datos no publicados):

-Si se miden los niveles de corriente en los ovocitos a temperatura ambiente en los ovocitos inyectados con el cRNA del canal de K⁺ *Shaker*, luego de la aplicación del protocolo de enfriamiento (PI4), se observa un aumento de 3 a 20 veces en los mismos (ver anexo I).

- El incremento observado de la corriente iónica en los ovocitos sometidos al protocolo PI4, resulta de la aparición de nuevos canales de K⁺ a la MP (ver Anexo II). Este incremento no es sensible a Cicloheximida (CHX), inhibidor de la síntesis proteica, ni a Brefeldina (Bref), un alcaloide que detiene el tráfico unidireccional de membrana desde el RE al aparato de Golgi, produciendo la acumulación de proteínas en el RE. Estos resultados indican que el aumento de la

corriente es debido al reclutamiento a la MP de canales desde algún compartimiento localizado entre el Golgi y la MP (ver anexo III).

- La inserción de nuevos canales de K^+ a la MP es insensible a la presencia de Ca^{2+} extracelular (ver anexo IV). Sin embargo el reclutamiento es sensible a la presencia de BAPTA en el citosol del ovocito, un tampón de Ca^{2+} . No obstante EGTA, otro tampón que captura el Ca^{2+} más lentamente, no altera la rapidez del reclutamiento. Estos resultados indicaron que el Ca^{2+} necesario para producir el reclutamiento tiene una presencia transitoria y localizada (ver anexo V).

- La inserción de canales es impedida por tapsigargina, un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, y también es inhibido por heparina, un antagonista del receptor del inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R) (ver anexo VI). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} que interviene en este proceso proviene de comportamientos intracelulares sensibles a Tapsigargina e IP_3 , posiblemente el RE, el Aparato de Golgi (Pinto y col, 1998) o la misma vesícula de transporte (De Blas y col., 2002). Interesantemente, en otro tipo de gameto, el espermio humano, la reacción acrosómica, la fusión del acrosoma a la MP del espermio, requiere de la presencia de Ca^{2+} en el acrosoma y de la actividad de IP_3R presentes en la mencionada vesícula.

Los ovocitos de *Xenopus* poseen principalmente IP₃R (la principal isoforma presente es la IP₃R₁), localizados principalmente en la región cortical y en el área perinuclear del retículo endoplasmático (RE) en el hemisferio animal (Parys y col., 1992). Una localización similar presentó la calreticulina y la calsecuestrina, dos proteínas que unen Ca²⁺ (Parys y col., 1994), aunque su rol no ha sido determinado. A su vez, los estudios de Han y Nuccitelli (1990), que examinaron la sensibilidad a IP₃ en las diferentes fracciones subcelulares de huevos de *Xenopus* sometidos a centrifugación, demostraron que la fracción enriquecida con RE exhibió la mayor liberación de Ca²⁺ de una manera dosis dependiente. Esto sugiere que el RE es el principal organelo de reservorio de Ca²⁺ dependiente de IP₃ en el ovocito de *Xenopus laevis*. Así, junto con la cercanía del RE a la MP en los cortes de microscopía electrónica (ME) (Zampighi y col., 1999), permite postular que la propagación de ondas de Ca²⁺ dependientes de IP₃ se restringe al dominio celular cercano a la MP.

Basados en estos antecedentes postulo mi hipótesis,

1.2. HIPOTESIS

Las últimas etapas de la inserción constitutiva de canales de potasio en ovocitos de *Xenopus laevis* es regulada por la actividad de receptores de IP₃, presentes en reservorios intracelulares de calcio.

1.3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del receptor de IP₃ en la inserción de canales de potasio tipo *Shaker* en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus laevis*.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Demostrar que los receptores de IP₃, presentes en el retículo endoplasmático, participan en la inserción de estos canales posterior a su arresto.

2.- Identificar el compartimiento subcelular en el cual los canales de potasio quedan arrestados a 4°C, detectando las formas de glicosilación del canal.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos.

Anti-IP₃R: a) anticuerpo policlonal contra 19 aminoácidos del C-terminal del IP₃R tipo II (gentileza Dra. Jaffe, Department of Cell Biology-University of Connecticut Health Center) y b) anticuerpo policlonal de conejo contra residuos 2732-2750 del IP₃R tipo I (Alomone); anti-HA de alta afinidad (3F10) de rata (Roche); anti-p230 trans Golgi monoclonal de ratón (BD Transduction Lab); anti-Na⁺/K⁺ ATPasa monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology); anti-PDI de ratón (BD Transduction Lab); anti-rata IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma); anti-ratón IgG y anti-conejo IgG conjugados con peroxidasa de rábano (Pierce); 2-APB, U-73122, U-73343 y endoglicosilasa H (Calbiochem); D-mio-inositol 1,4,5 tris-fosfato sal de amonio, Brefeldina, Tapsigargina (Sigma).

2.2 Biología Molecular.

El DNA de interés, que codifica para un canal de K⁺ tipo Shaker B (Δ 6-46) que en el extremo amino terminal tiene adicionado un epítipo de hemoaglutinina (HA)- YPYDVPDYA-unido por un segmento de 5

aminoácido. Esta construcción está inserta en un plásmido pBLUESCRIPT circular que contiene el gen que codifica la Beta-lactamasa y confiere resistencia a la ampicilina solo a las bacterias transformadas. La amplificación del DNA se hizo en cepas estándar de *E. coli* hechas competentes por el método de CaCl₂/RbCl (Cohen y col., 1972). El DNA fue extraído por lisis alcalina y purificado por el método de columna (Kit de purificación de plásmidos QIAGEN), precipitado con etanol y resuspendido en 20 µl de agua. La pureza y concentración del DNA fueron evaluadas por espectrofotometría ultravioleta. El cDNA se linealizó con la enzima de restricción NotI (New England Biolabs, Beverly, MA). El RNA se sintetizó *in vitro* con mMessage-Machine (Ambion). La integridad y concentración del cRNA se evaluó por electroforesis en geles desnaturizantes y por absorbancia a luz de $\lambda = 260$ nm en espectrofotómetro.

2.3 Generación de mutantes.

Se generó una doble mutante de glicosilación (N259QN263Q) utilizando el método de QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.4 Expresión de los canales de K⁺ en ovocitos de Xenopus laevis.

Los ovocitos de *Xenopus* (estado VI) se obtuvieron de hembras adultas luego de anestesiarlas por inmersión en 1,5 mg/ml (0,75 g/500ml) de Etil 3-aminobenzoato metanosulfónico (Aldrich Chemical Company, Inc.). Uno o dos lóbulos de un ovario fueron extraídos a través de una incisión de 10 a 12 mm hecha en condiciones estériles. La capa folicular que recubre los ovocitos fue extraída por tratamiento con colagenasa tipo 2 (1 mg/ml) (Worthington Biochemical) por 50 minutos en una solución nominalmente libre de Ca²⁺ (en mM: 82,5 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgCl₂ y 5 HEPES titulada a pH 7,6 con NaOH). La expresión del canal de K⁺ se llevó a cabo inyectando los ovocitos con el RNA sintetizado in Vitro- Message Machine Kit, Ambion- (0,5 a 50 ng). Los ovocitos fueron mantenidos a 17°C en solución SOS (en mM: 100 NaCl, 2,5 KCl, 1,8 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 5 Hepes; pH 7,4) hasta el momento de la inyección.

2.5 Electrofisiología.

Los ovocitos inyectados típicamente se sometieron a dos protocolos de incubación: a 17°C durante todo el tiempo ("*Protocolo de Incubación Normal*", PII7) y/o se incubaron a 17°C por 6 horas para

obtener cierto nivel de expresión del canal y posteriormente a 4°C por 15 a 24 horas (*“Protocolo de Incubación a 4°C”, PI4*). Los registros se obtuvieron colocando los ovocitos en una cámara diseñada para la técnica de “control de voltaje con dos electrodos” (“Two electrode voltage-clamp”). Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente, aproximadamente entre 20 y 23 °C. El potencial de mantenimiento aplicado fue de -90 mV y el valor de la corriente para confeccionar el curso temporal fue tomado en el estado estacionario durante un pulso a +40 mV de 50 ms de duración. Este pulso se repite cada minuto. Se utilizó una solución SOS para el baño de la cámara de registro y una solución de KCl 3M para los electrodos de Borosilicato (M1B150F-3, World Precision Instruments, Inc.), de resistencia de 0,2-1 MΩ. Los datos fueron adquiridos con el programa WCP y analizados con el programa CLAMPFIT 9 del paquete Origin pCLAMP (Axon Instrument).

Para comparar los niveles de corriente máxima en diferentes situaciones experimentales, el potencial de mantenimiento aplicado fue de -90 mV y el valor de la corriente fue considerado al final de un pulso de 60 ms de duración a +70 mV.

2.6 Cuantificación de IP₃.

Para medir el contenido de IP₃ de las preparaciones de ovocitos, se extrajeron las fracciones de membrana con ácido perclórico (8% P/V). Los extractos de ácido perclórico fueron neutralizados con KOH/MES. El contenido de los extractos fue analizado usando el ensayo de radiorreceptor descrito por Bredt (Bredt y col, 1989). Membranas cerebelares, aisladas desde ratas machos Sprague-Dawley, fueron incubadas por 20 minutos a 4°C en una solución que tenía entre sus componentes [³H] IP₃ y concentraciones variables de IP₃, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), ATP o extractos de membrana neutralizados. Para detener la reacción, las membranas fueron sedimentadas a 12.000 x g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante (SN) y se determinó la radioactividad asociada a las fracciones precipitadas luego de transferirlas a viales de centelleo líquido. La unión no específica se midió en presencia de 2 µM de IP₃. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Cecilia Hidalgo (Instituto de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina-Universidad de Chile).

2.7 Determinación de niveles de expresión del canal.

Entre 20 a 30 ovocitos fueron disueltos en Buffer de Lisis (en mM: 200 NaCl, 20 Tris/HCl pH 7,6, 1% Triton X-100) y homogenizados con un microhomogenizador de vidrio. Se incubaron 30 minutos en hielo y luego centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, recuperándose el sobrenadante. Los mismos son guardados a -80°C hasta ser utilizados para experimentos de Western Blot. En los casos que se especifiquen, los sobrenadantes fueron incubados con la enzima Endoglicosilasa-H.

2.8 Determinación de expresión del canal en membrana plasmática del ovocito.

30 ovocitos fueron lavados 3 veces con SOS frío y posteriormente incubados por 1 hora y 30 minutos con agitación en SOS conteniendo 1 mg/ml de Biotina (EZ-Link Sulfa-NHS-LC-Biotin-Pierce). A continuación, los ovocitos, fueron lavados con SOS frío conteniendo 15 mM de glicina y disueltos en Buffer de Homogenización (en mM: 200 NaCl, 20 Tris/HCl pH 7,6, 1% Triton X-100) y homogenizados con un microhomogenizador de vidrio. Se incubaron 30 minutos en hielo y luego centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, recuperándose el sobrenadante. Este fue incubado por dos horas a 4°C con estreptavidina (Immobilized Streptavidin-Pierce). Posterior a varios lavados en Buffer

de Homogenización, se resuspendió el precipitado final y se guardó a -80°C hasta ser utilizado en experimentos de Western Blot.

2.9 Fraccionamiento subcelular.

200 ovocitos fueron homogenizados con un microhomogenizador en 0,32 M de sacarosa en tampón TE (en mM: 50 Tris HCl pH 7,5, 1 EDTA) suplementado con inhibidores de proteasas: PMSF 20mg/ml, Leupeptina 1-25 mg/ml y Pepstatina 1-25 mg/ml. Posteriormente fueron centrifugados dos veces a 1.000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante final es ubicado sobre un gradiente continuo de sacarosa (entre 0,6 y 2,0 M) en tampón TE suplementado con 5 mM de MgCl₂. Luego de centrifugar a 40.000 rpm en rotor SW 60 i de Beckman por 3 hs a 4°C, se recopilan fracciones, desde el fondo del tubo de centrifugación, de 500 ul cada una. Las mismas son guardadas a -80°C hasta ser utilizadas para experimentos de Western Blot.

2.10 Electroforesis y Western Blots.

En primer lugar se midió el contenido de proteínas de las muestras utilizando el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente las proteínas fueron

separadas en geles de SDS-poliacrilamida de 9% a 170V y transferidas a membranas de PDVF toda la noche (ON) a 30 V a 4°C. Para los experimentos de inmunodetección las membranas fueron bloqueadas por 4 hs en TBS (en mM: 50 NaCl, 2,8 KCl y 25 Tris base) con 5 % P/V de leche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron diluidos en TBS con 1 % P/V de leche descremada en polvo e incubados ON: anti-HA (1/ 10.000, 100 µg/ml), anti-IP3R (1/ 5.000, 0,3 µg/µl, Alomone), anti-Na⁺K⁺ ATPasa (1/ 10.000, 250 µg/ml), anti-PDI (1/500, 250 µg/ml) y anti-p230 (1/ 10.000, 250 µg/ml). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron diluidos en TBS con 1 % P/V de leche descremada en polvo, filtrados e incubados por 5 hs a temperatura ambiente: anti-rata, anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (1/ 10.000, 10 ug/ml - Kit Pierce). Los lavados entre las diferentes incubaciones se realizaron con TBS. Las membranas que fueron utilizadas para la detección de mas de una proteína, fueron sometidas a una incubación por 10 min con NaOH 0,5 M, con el fin de remover los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas a la membrana para reutilizarla. La marcación de los anticuerpos fue detectada utilizando Super Signal West Femto maximum Sensitivity Substrate.

RÉSULTADOS

3.1. El Ca^{2+} , proveniente del RE a través de los IP_3R , participa en la inserción de canales de K^+ a la MP.

En primer lugar, con el fin de realizar experimentos de localización de la proteína *Shaker* y poder detectarla con anticuerpos, preparé una variante de *Shaker B* ($\Delta 6-46$) con el epítipo de hemoaglutinina (HA) adicionado al extremo amino de la proteína mediante un lazo de 5 residuos aminoacídicos (Figura 5). A esta variante le llamamos HA-*Shaker*.

A continuación, se comprobó que la adición del epítipo de HA, no interfiere con el fenómeno de tráfico a la MP observado previamente.

3.1.1 Aumento del número de canales funcionales en la MP del ovocito.

Ovocitos inyectados con el cRNA de HA-*Shaker* fueron sometidos a los protocolos experimentales de incubación normal a 17°C (PI17) y arrestados a 4°C (PI4). En la Figura 6 se grafica la amplitud de la corriente iónica versus tiempo en ovocitos sometidos a una de las dos

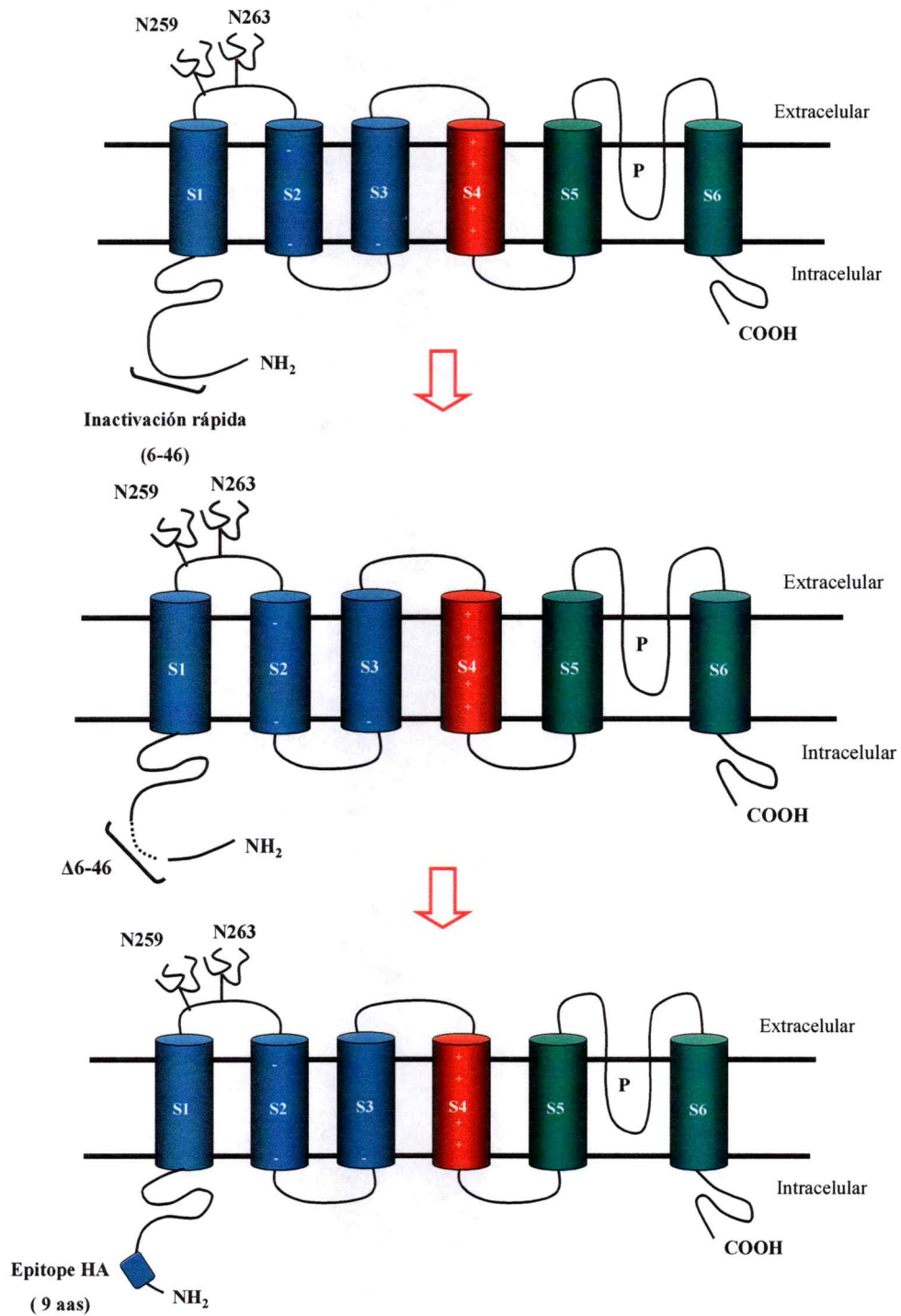


Figura 5. Esquema de la adición del epítipo HA en el amino terminal del canal.

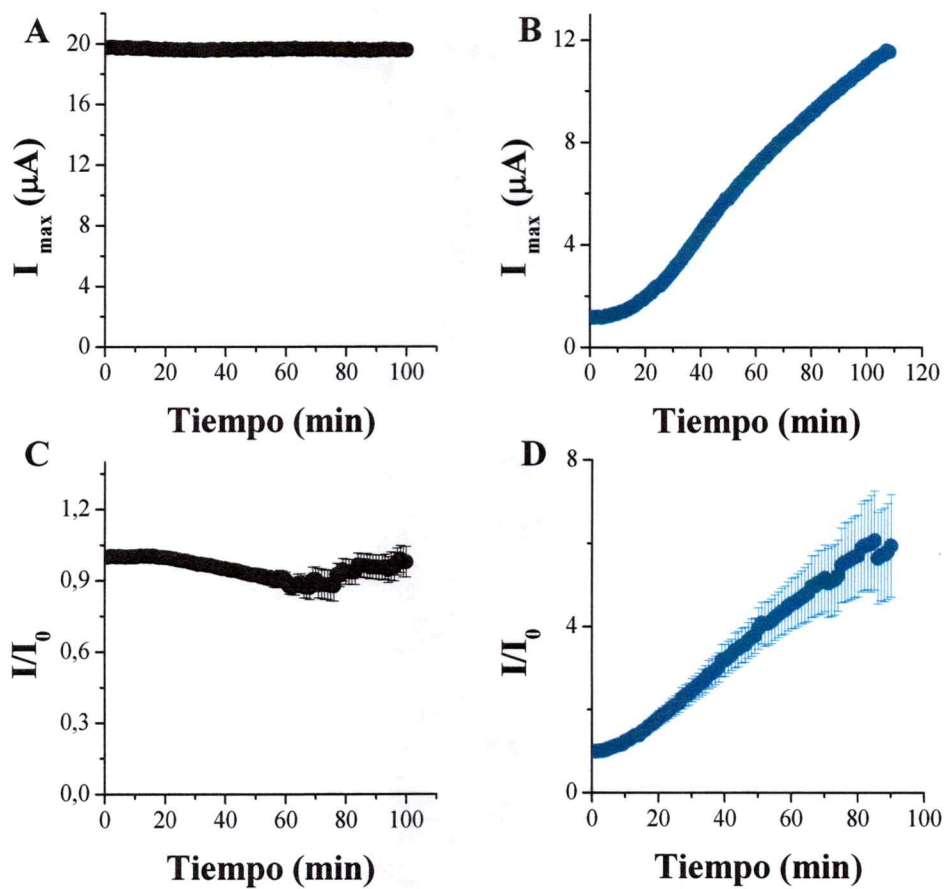


Figura 6. La adición del epítipo de HA, no interfiere con el fenómeno de tráfico a la MP. Curvas corriente versus tiempo obtenidas con la variante HA-Shaker para un ovocito sometido al PI17 (A) y para un ovocito arrestado mediante el protocolo PI4 (B). Curvas promedio de las corrientes normalizadas (I/I_0) versus tiempo para ovocitos PI17 (C) y para ovocitos PI4 (D).

condiciones de incubación, PI17 (A) y PI4 (B). El aumento de la corriente iónica observado en B corresponde al reclutamiento de nuevos canales de K^+ a la MP. En la Figura 6 también se muestran curvas promedio de las corrientes normalizadas (I/I_0) versus tiempo para ovocitos PI17 (n=29) (C) y para ovocitos PI4 (n=28) (D).

Los resultados mostrados hasta aquí replican fielmente lo observado previamente con *Shaker* silvestre. Esto nos indica que la adición del epítipo HA, que nos permitirá detectar al canal en los experimentos de inmunodetección, no alteró su incorporación a la MP. Por lo tanto podemos utilizar esta variante del canal para poder comparar y relacionar los datos electrofisiológicos con los resultados bioquímicos.

3.1.2 Rol del IP_3R en el reclutamiento de los canales de potasio.

Dada la sospecha de la participación de los receptores de IP_3 (IP_3R) en la inserción de los canales de K^+ en la MP, se utilizaron dos estrategias experimentales para bloquear el receptor y estimar su rol en este proceso. En la Figura 7 se esquematiza el punto de acción de los compuestos utilizados. En primer lugar se empleó un anticuerpo anti- IP_3R que inhibe específicamente la actividad de este receptor. Este anticuerpo policlonal, contra 19 aminoácidos del carboxi-terminal del

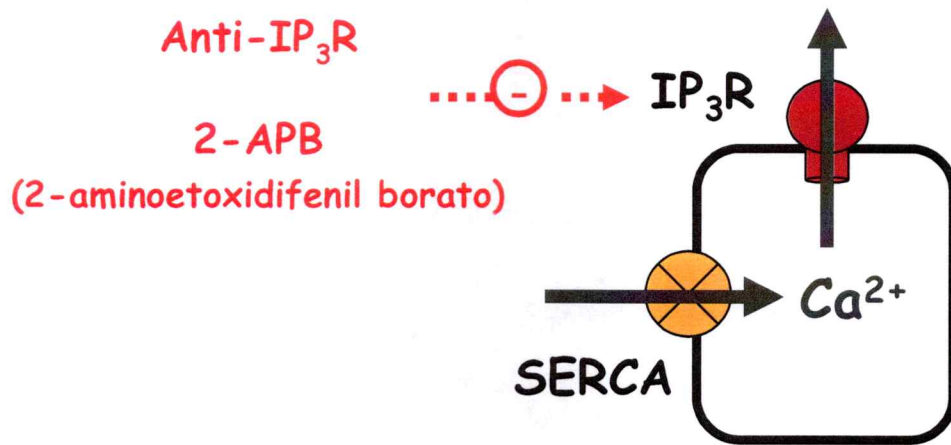


Figura 7. Esquema de acción de los compuestos utilizados para bloquear al IP₃R.

IP₃R tipo I, inhibe un paso posterior a la unión del IP₃, ya que su acción no reduce la unión de IP₃ a membranas de cerebelos caninos o IP₃R purificados (Runft y col., 1999). En la Figura 8 se comparan el efecto de las inyecciones del anticuerpo anti-IP₃R sobre las curvas de corriente normalizada vs. tiempo en ovocitos sometidos a los protocolos PI17 y PI4. En el ovocito PI17 inyectado con el anti-IP₃R (n=4) (A) observamos una disminución de la corriente unos 50 minutos posteriores a la inyección del anticuerpo. No podemos afirmar que esta disminución sea una consecuencia de la inyección del anticuerpo, ya que en huevos controles también se ve una reducción similar de la corriente en tiempos mayores a 50 minutos (ver figura 6 C). En la curva corriente normalizada versus tiempo para el ovocito arrestado y sometidos a registro inmediatamente después de ser inyectados con el anticuerpo contra el IP₃R (1mg/ml) (n=3) (B), se observa una disminución abrupta y rápida de la corriente. Como control, se realizaron experimentos inyectando un anticuerpo no relacionado con el IP₃R (secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano). Como se observa en C (n=2) y D (n=2) la inyección de este anticuerpo no afecta los registros de los ovocitos sometidos a los protocolos PI17 y PI4. A pesar de que el efecto de la inyección del anticuerpo tiene una cinética mucho más rápida que la esperada para una proteína cuya masa molecular es de decenas de kDa,

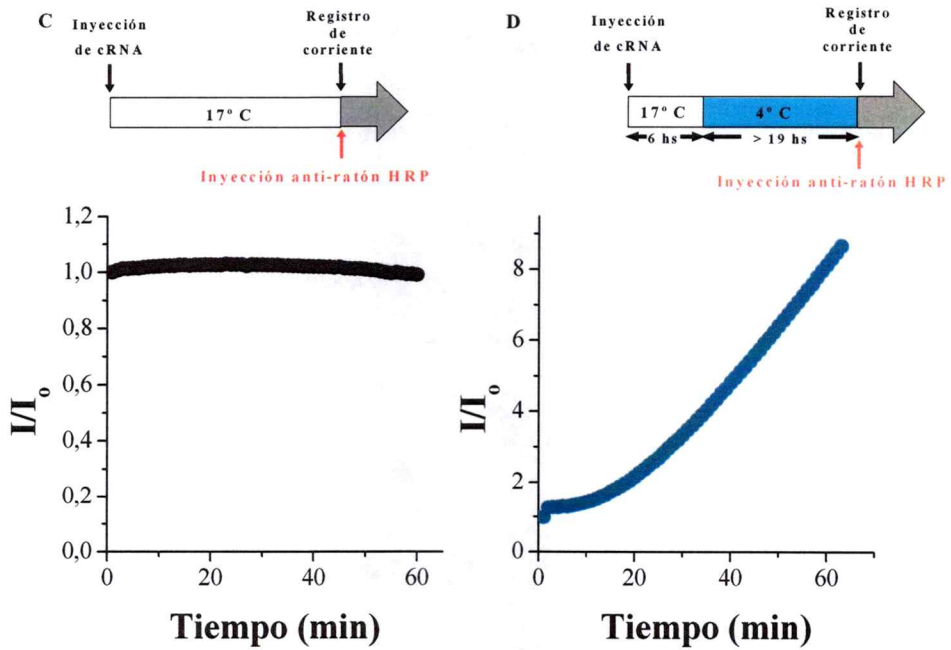
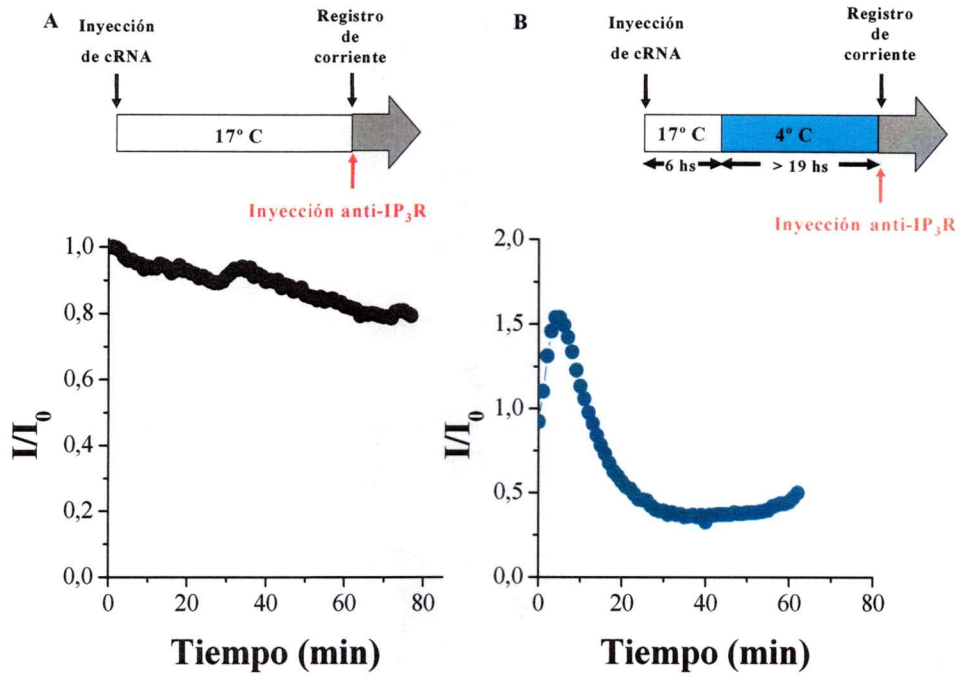


Figura 8. Efecto del IP_3R en el transporte del canal a la membrana plasmática I. Curvas corriente normalizada (I/I_0) versus tiempo para un ovocito sujeto al protocolo PI17 (A y C) y otro al protocolo PI4 (B y D) y sometidos a registro inmediatamente después de ser inyectados con el anticuerpo contra el IP_3R (1mg/ml) (A y B). Como control se realizó el mismo experimento pero inyectando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (C y D)

este resultado sugiere que el efecto observado es específico del anticuerpo contra el IP₃R. Estos resultados indican que el fenómeno de reclutamiento requiere de la actividad de los IP₃R (Runft y col., 1999), y probablemente es regulado por reservorios de Ca²⁺ dependientes de IP₃.

En vista del efecto inesperadamente rápido de la inyección del anticuerpo anti- IP₃R utilizamos el 2 aminoetoxidifenil borato (2-APB), un antagonista permeable a membrana del IP₃R. Esta droga bloquea reversible y eficientemente la vía de señalización mediada por IP₃ en ovocitos de *Xenopus laevis* en una etapa posterior a la producción de IP₃ pero antes de su acción en la mediación del aumento del Ca²⁺ celular. Se utilizó esta droga a una concentración de 50 µM apoyándonos en experimentos anteriores en los cuales esta concentración bloqueó efectiva y reversiblemente la robusta liberación de Ca²⁺ mediada por IP₃ en ovocitos de *Xenopus* (Chorna-Ornan y col., 2001).

Al aplicar esta droga durante el registro se observó:

- en los ovocitos PI17 (Figura 9 A), una disminución sostenida de la corriente, la cual se interrumpió al perfundir con una solución libre de 2-APB. Este comportamiento se repitió en 7 de 7 ovocitos registrados.

- en los ovocitos PI4 (Figura 9 B), se observa una reducción en la rapidez del aumento de la corriente, hasta llegar a un nivel casi estacionario. Nuevamente, al lavar la droga, la curva recupera su

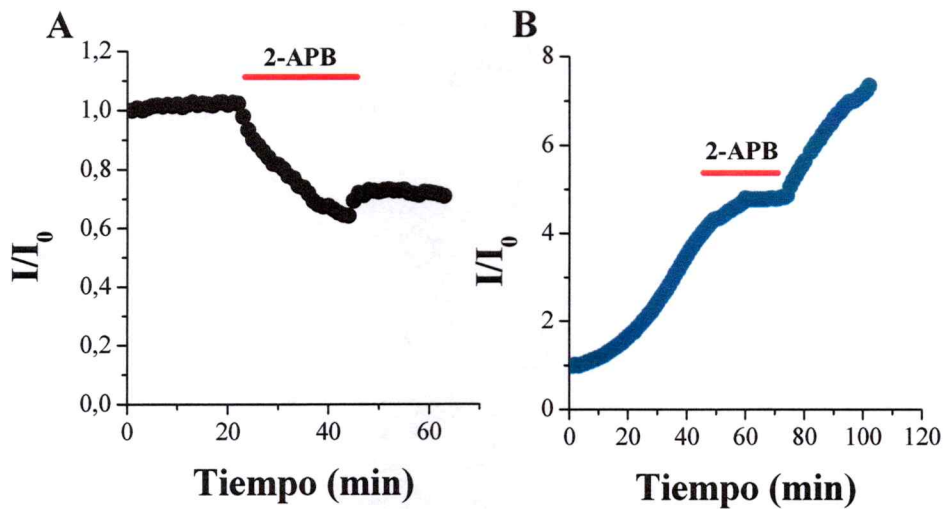


Figura 9. Efecto del IP_3R en el transporte del canal a la membrana plasmática II. Curvas corriente normalizada (I/I_0) versus tiempo para un ovocito PI17 (A) y para un ovocito PI4 (B) incubados con $50 \mu M$ 2-APB. Las barras rojas muestran el tiempo durante se perfundió la droga.

pendiente original, indicando que el proceso de incorporación de canales continúa. Esta misma observación se repite en 9 de 9 ovocitos registrados. En ningún caso se observó una disminución de la corriente al incubar con la droga.

Si consideramos que la estabilidad del nivel de corriente en los ovocitos no arrestados resulta del balance entre endocitosis y exocitosis que mantiene constante la corriente en el tiempo, la acción de 2-APB sobre los IP₃R inhibiría la exocitosis, y/o estimularía la endocitosis. Al lavar la droga se llegaría a un nuevo equilibrio entre los dos procesos. Así el efecto del 2-APB sobre los ovocitos arrestados, sugiere que en estos la velocidad de endocitosis es menor que el de los ovocitos no arrestados.

3.1.3 Cuantificación de los niveles de IP₃.

Si el Ca²⁺ que regula este fenómeno proviene de reservorios de Ca²⁺ activados por IP₃, ¿existirán diferencias entre los niveles de IP₃ de huevos sometidos a los dos protocolos de incubación que nos permitan explicar la observación del aumento de la corriente en los huevos arrestados? ¿Podría ser que el tratamiento de incubar los ovocitos a 4°C produce una disminución de la concentración de IP₃ citosólico? Para resolver estas preguntas medimos directamente los niveles de IP₃ en huevos arrestados y no arrestados, usando un protocolo de

desplazamiento de $^3\text{H-IP}_3$ en membranas de cerebelo (ver métodos).

En la Tabla 1 se muestran los valores de concentración de IP_3 para ovocitos sometidos al protocolo de arresto (n=2 experimentos) y para ovocitos sometidos al protocolo control (n=2 experimentos)

Para nuestra sorpresa, los ovocitos arrestados arrojaron una concentración de IP_3 aproximadamente 4 veces superior a la de los no arrestados. Por lo tanto los niveles citosólicos de IP_3 en régimen estacionario no explican las diferencias en los niveles de corriente mostrados en ambos protocolos de (ver discusión).

3.1.4 Efecto de las variaciones de IP_3 en la inserción de los canales.

Como el IP_3 estaría regulando la liberación de Ca^{2+} desde el RE promoviendo así la llegada de los canales a la MP, planteamos la posibilidad de alterar el tráfico de los canales perturbando los niveles de IP_3 en los ovocitos.

Para este propósito se utilizaron dos tácticas diferentes: aumentar los niveles de IP_3 inyectándolo directamente o disminuyendo los niveles de IP_3 inhibiendo la enzima que participa en su producción.

En primer lugar, se inyectaron 50 nl de IP_3 10 μM antes de comenzar el registro. La concentración nominal de IP_3 en los ovocitos

Condición	Conc. IP ₃ (nM)
Ovocitos Arrestados (PI4)	125,5 ± 0,4
Ovocitos No Arrestados (PI17)	31,9 ± 6,1

Tabla 1. *Valores de concentración de IP₃ en ovocitos arrestados (PI4) y ovocitos no arrestados (PI17).* Los datos representan las medias de concentración de IP₃ ± su error standard en ovocitos sometidos a ambos protocolos experimentales (n=2). P<0,05 (Prueba t de Student).

después de la inyección está en torno a $0,5 \mu\text{M}$. En la Figura 10 se muestran las curvas promedio de las corrientes normalizadas (I/I_0) vs. tiempo en ovocitos no arrestados y arrestados e inyectados con IP_3 (A y B). En ambos casos la inyección de IP_3 no favoreció la inserción de los canales, ya que las pendientes de las curvas entre ovocitos no inyectados e inyectados no cambiaron significativamente.

Contrariamente a lo esperado, en los ovocitos arrestados inyectados con IP_3 se observa un menor aumento de la corriente en comparación con los ovocitos arrestados a tiempos mas prolongados.

En segundo lugar se empleó el U-73122, un inhibidor permeable de la actividad fosfolipasa C (PLC) y el U-73343, un análogo inactivo del U-73122, como control negativo (Figura 11).

Se incubaron los ovocitos con ambas drogas a una concentración de $20 \mu\text{M}$ durante su registro y se observó:

- en los ovocitos no arrestados (Figura 12 A), una disminución de la corriente durante la aplicación de U-73122, la cual no se interrumpe al lavar la droga, mientras que la aplicación de U-73343 no produce modificaciones significativas.

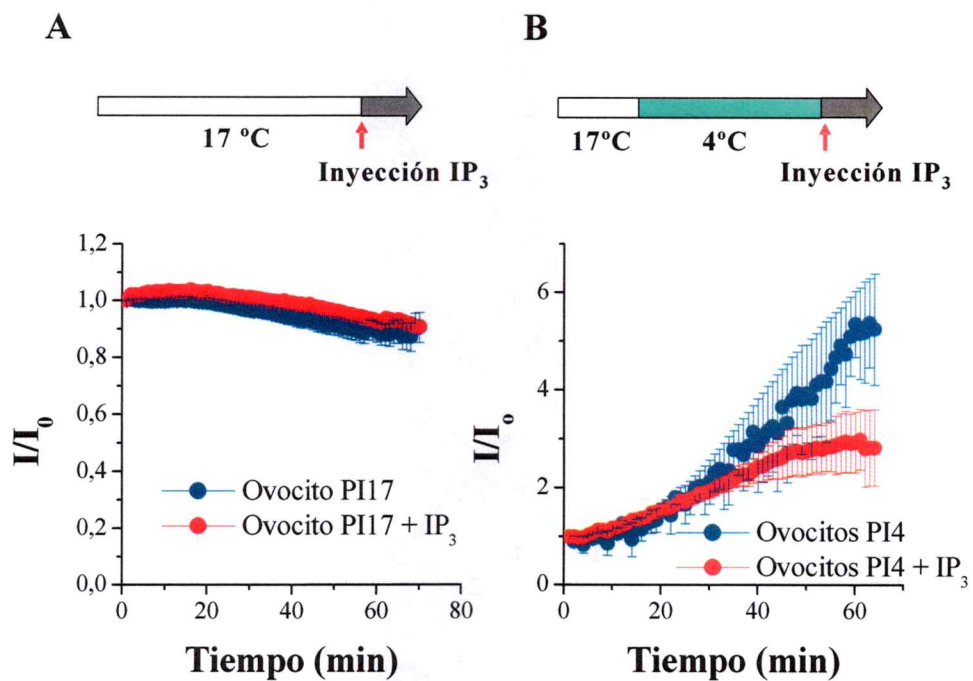


Figura 10. Efecto de la inyección de IP₃ en el transporte del canal a la MP. Se comparan curvas promedio de las corriente normalizadas (I/I_0) versus tiempo (min) para ovocitos no arrestados (A) y para ovocitos arrestados (B) y ovocitos sometidos a los mismos protocolos y registrados inmediatamente después de ser inyectados con 50 nl de IP₃ (10 μ M).

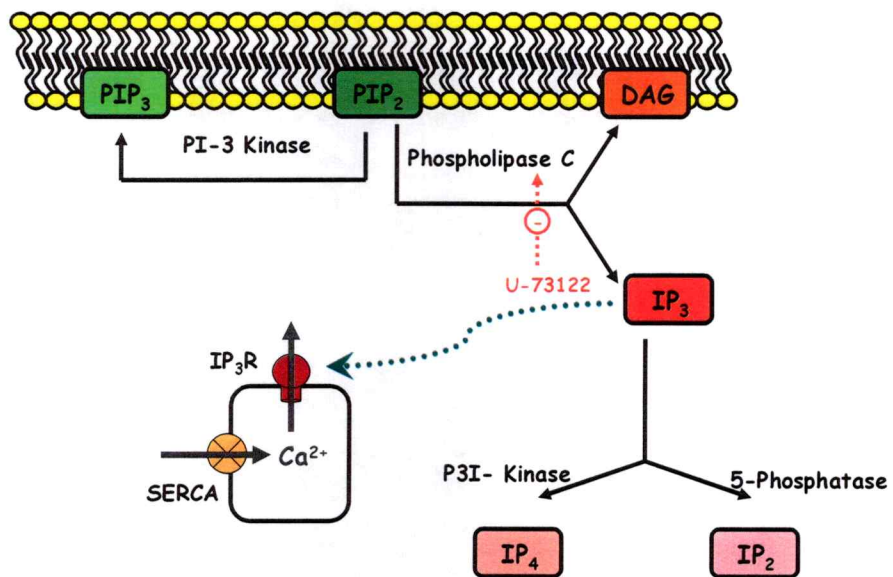


Figura 11. Esquema del sitio de acción del U-73122

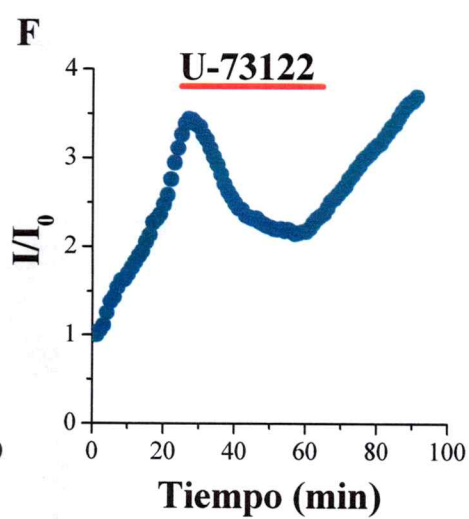
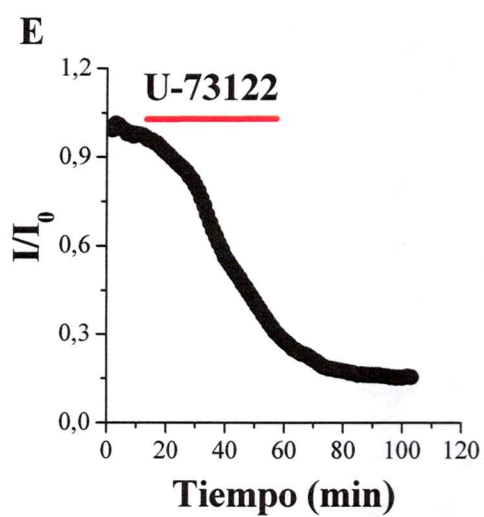
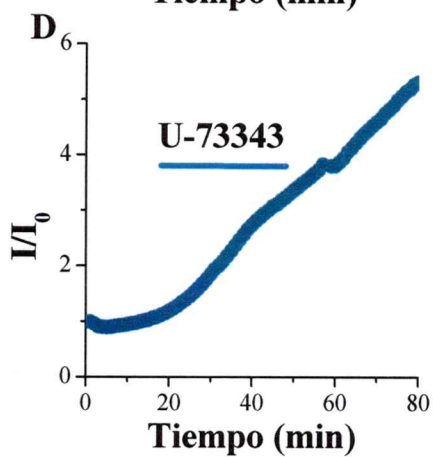
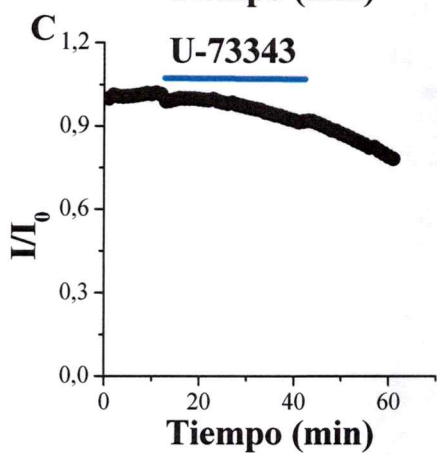
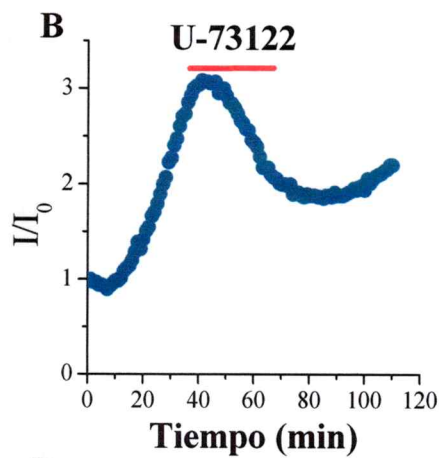
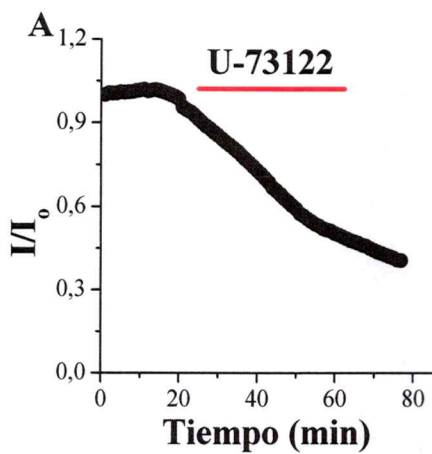


Figura 12. Efecto de la inhibición de la PLC en el transporte del canal a la MP. Se muestran las curvas corriente normalizada versus tiempo para ovocitos no arrestados (A, C y E) y para ovocitos arrestados (B, D y F) perfundidos con U-73122, en dos concentraciones, y U-73343. En A y B se utilizaron U-73122 20 μ M y en E y F 10 μ M. Como control en C y D se usaron U-73343 20 μ M. Las barras rojas muestran el tiempo durante el que se perfundió U-73122 y las azules el U-73343.

Este comportamiento se repite en 4 de 4 ovocitos registrados para el U-73122 y en 3 de 3 ovocitos para U-73343.

-en los ovocitos arrestados (Figura 12 B), hay una abrupta reducción de la corriente durante la aplicación de U-73122, la cual se recupera luego de unos minutos del lavado. La aplicación de U-73343 no produce modificaciones significativas. Esta misma observación se repite en 4 de 4 ovocitos registrados para el U-73122 y en 3 de 3 ovocitos para U-73343.

Se repitieron los experimentos utilizando una concentración menor (10 μM) y se obtuvieron resultados similares (n=3).

Se intentó revertir el efecto del inhibidor de PLC inyectando, luego de su aplicación, IP_3 (10 μM). En la Figura 13 se muestran las curvas promedio de las corrientes normalizadas (I/I_0) vs. tiempo en ovocitos no arrestados y arrestados perfundidos con U-73122 y posteriormente inyectados con IP_3 (A y B). En ambos casos la inyección de IP_3 no revirtió el efecto de la aplicación del inhibidor de la PLC. Para comprobar que el IP_3 que estamos inyectando es viable y posee por sí mismo un efecto en el ovocito, registramos las corrientes de cloruro activadas por calcio que deberían formarse ante un aumento de calcio intracelular generado por la acción del mensajero sobre el IP_3R del RE.

En la figura 13 C se observan las corrientes que se activan inmediatamente luego de inyectar el IP_3 .

Estos datos nos mostrarían que la perturbación de la producción de IP_3 interrumpe el proceso de tráfico proteico. Mientras que los resultados de inyección de IP_3 nos permitirían especular que este proceso procede a niveles basales de IP_3 presentes en el ovocito (ver discusión).

3.2 Identificación del compartimiento subcelular en el cual los canales de potasio se acumulan durante la incubación a 4°C.

Con la estrategia diseñada en el laboratorio, en la cual inducimos una interrupción en el transporte proteico por temperatura, es posible estudiar los últimos pasos del tráfico de los canales de K^+ a la MP y su regulación. Entonces, hipotetizamos que al arrestar los ovocitos, los canales quedarían detenidos en algún compartimiento subcelular.

Nuestro siguiente objetivo fue tratar de identificarlo.

3.2.1 Comparación de los niveles de corriente iniciales.

Para iniciar, quisimos comparar los niveles de corriente total de los ovocitos antes de colocarlos a una temperatura de 4°C y en el momento de sacarlos de la misma. Se realizaron mediciones de niveles de corriente en tres condiciones experimentales: en los ovocitos 6 horas posterior a la inyección del cRNA e incubados a 17°C, en los ovocitos

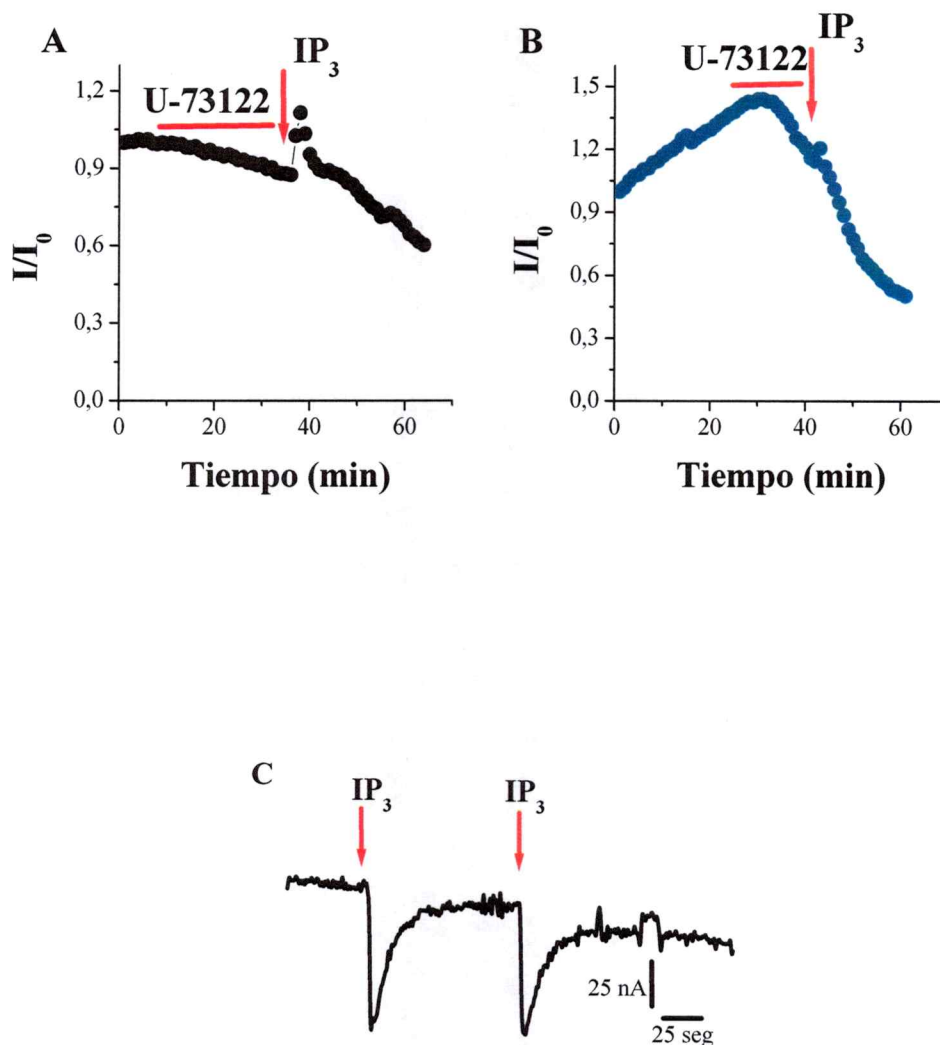


Figura 13. *Inyecciones de IP₃ no revierten el efecto de la inhibición de la PLC en el transporte del canal a la MP.* Se muestran las curvas corriente normalizada versus tiempo para ovocitos no arrestados (A) y para ovocitos arrestados (B) perfundidos con U-73122 (20 μ M) y posteriormente inyectados con IP₃ (10 μ M). En C se muestran las corrientes de cloruro activadas por calcio inducidas por la inyección de IP₃. Las barras rojas muestran el tiempo durante el que se perfundió U-73122 y las flechas rojas indican el momento en el cual se inyectó el IP₃.

luego de ser sometidos al protocolo PI17 y en los ovocitos luego de ser sometidos al protocolo PI4 (Figura 14).

Se observaron niveles similares de corriente entre los ovocitos del protocolo PI4 y los registrados 6 horas posteriores a inyección del cRNA, ambos significativamente menores a los de los ovocitos del protocolo PI17 (se realizaron 3 experimentos donde se utilizaron 10 ovocitos por condición). Los resultados indican que, al momento de sacarlos del arresto, los ovocitos sólo poseen los canales que pudieron llegar a la membrana durante las 6 horas previas a la incubación a 4°C.

3.2.2 Identificación de las especies del canal.

Durante la expresión del canal de K⁺ tipo *Shaker* en ovocitos se identifican claramente dos formas de glicosilación correspondientes a diferentes etapas de maduración en su transporte a la MP. En un sencillo ensayo bioquímico, como el Western Blot, estas formas se distinguen por el cambio de movilidad electroforética que resulta del aumento de su peso molecular producido por la adición de azúcares. Dado que con la incubación a 4°C provocamos una interrupción del tráfico proteico, quisimos identificar, de acuerdo a su grado de glicosilación, las especies presentes en cada uno de los protocolos utilizados. Para una primera aproximación se realizó una lisis total de ovocitos sometidos a los

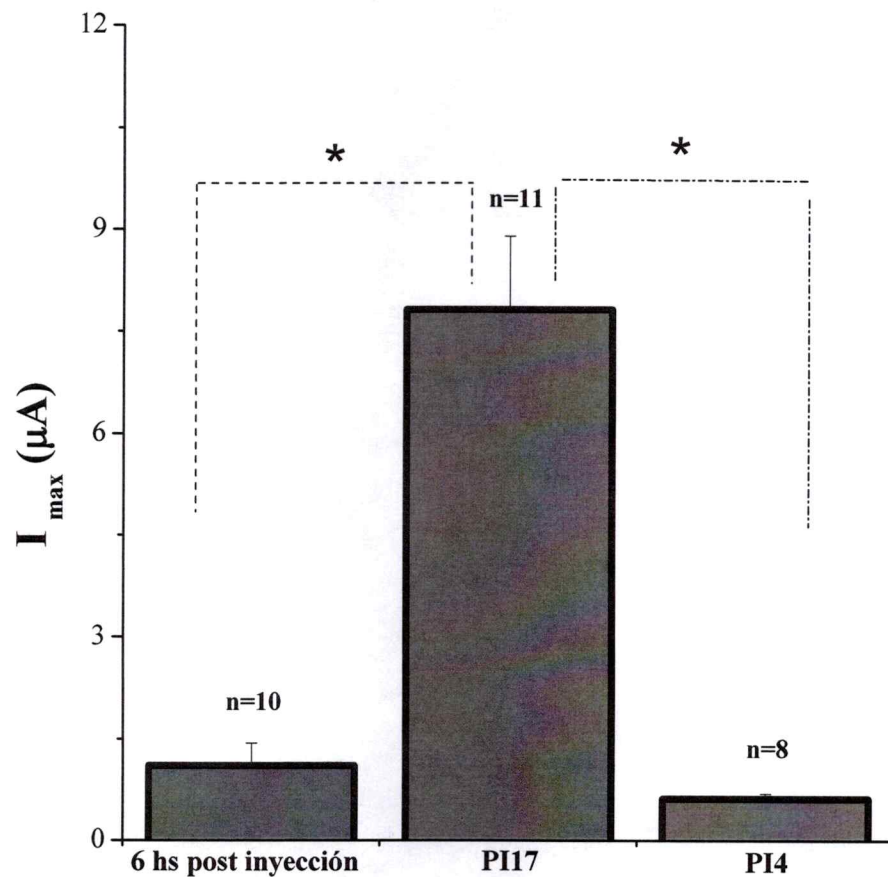
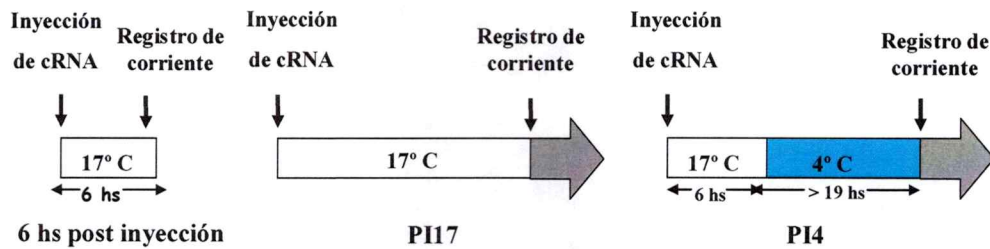


Figura 14. Comparación de los niveles de corriente inicial. Niveles de corriente máxima medidas al final de un pulso despolarizante, en tres condiciones experimentales: 6 horas posterior a la inyección de RNA, ovocitos PI17 y ovocitos PI4. Los datos representan las medias \pm su error standard. En la parte superior se muestran cada uno de los protocolos.

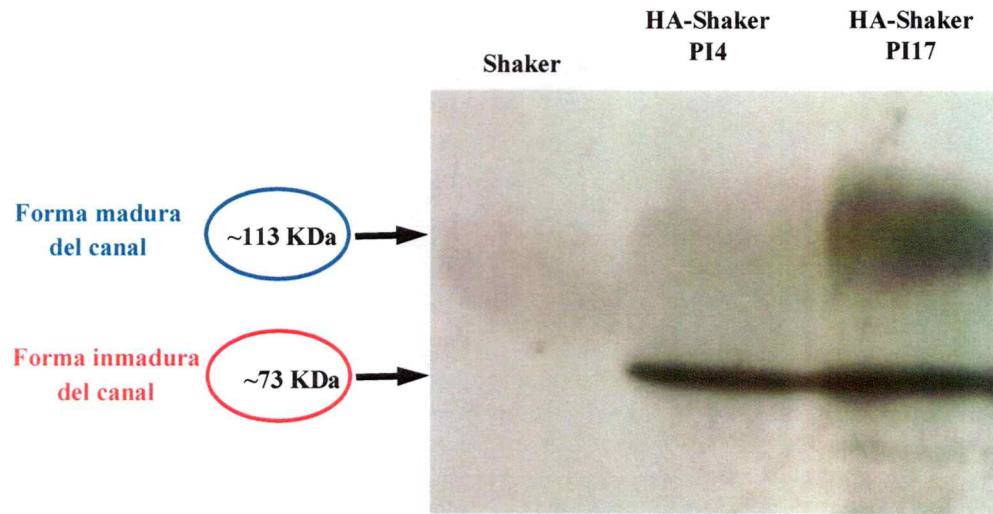
*, $P < 0,05$ (Prueba t de Student)

diferentes protocolos y posteriormente se realizó un Western Blot, usando un anticuerpo primario anti-HA. En la Figura 15 A se observa que los ovocitos no arrestados presentan dos bandas principales de la proteína de *Shaker*: una correspondiente a ~73 kDa y otra de ~113 kDa.

En los ovocitos sujetos al protocolo de arresto se observó predominantemente la banda de menor peso molecular (n=5 experimentos). La banda de ~73 kDa correspondería a una forma inmadura de canal (con oligosacáridos ricos en manosa) producida a nivel del RE, en cambio, la gruesa y difusa banda de ~113 kDa pertenecería a la forma madura del canal, que ya ha sido transportada a través del aparato de Golgi (Santacruz-Tolozá y col., 1994).

La banda de menor peso molecular es sensible al ensayo de endoglicosilasa H (Endo-H), que digiere a los oligosacáridos ricos en manosa de proteínas presentes en el RE o *cis*-Golgi (Maley y col., 1989). La acción de la enzima produce una banda de 68 kDa, la que coincide con la banda correspondiente al doble mutante de glicosilación (N259QN263Q). En cambio, de acuerdo a lo esperado para la proteína madura, la banda de ~113 kDa es insensible a la enzima (Figura 15 B).

A



B

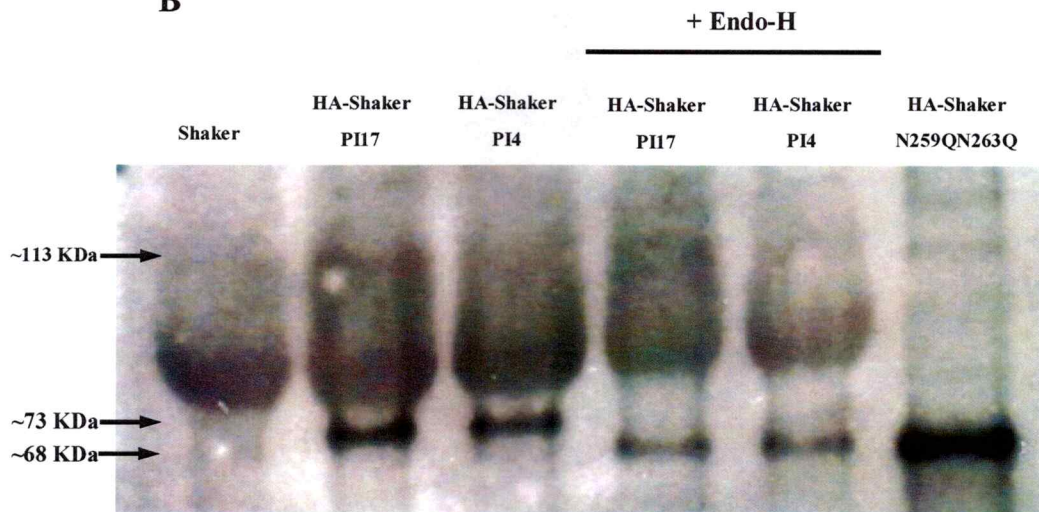


Figura 15. Formas del canal. En A se muestra un Western Blot de ovocitos totales sometidos a los protocolos de PI4 y PI17. En B se repiten los ensayos incluyendo experimentos incubando con endoglicosilasa H y una doble mutante de glicosilación. Como control se utilizó un canal *Shaker* sin HA.

Esto nos permite proponer que la banda ~73 kDa corresponde a la forma inmadura del canal que usualmente es retenida a nivel del RE y que los ovocitos arrestados presentan principalmente esta variedad del canal.

Dado que los ovocitos arrestados presentan principalmente la forma inmadura del canal, ¿será esta especie la presente en la MP de estos ovocitos?

Utilizando un protocolo de biotinización, para aislar la fracción de MP (ver materiales y métodos), pudimos comprobar que los ovocitos no arrestados presentan ambas bandas, principalmente la que corresponde a la forma madura del canal, mientras los ovocitos arrestados, para nuestra sorpresa, presentan la banda correspondiente a la forma inmadura, sensible a Endo-H (Figura 16) (n=5).

Como control de los experimentos de biotinización, para probar que la abundancia de la proteína inmadura en ambos carriles de MP no se debía a contaminación por el RE, se realizó un Western Blot con estas muestras y como control positivo una muestra de lisis total. Como indicador de contaminación por membrana de RE, revelamos con un anticuerpo contra el IP₃R. La ausencia de señal en las fracciones biotiniladas nos indica que la contaminación con membrana de retículo

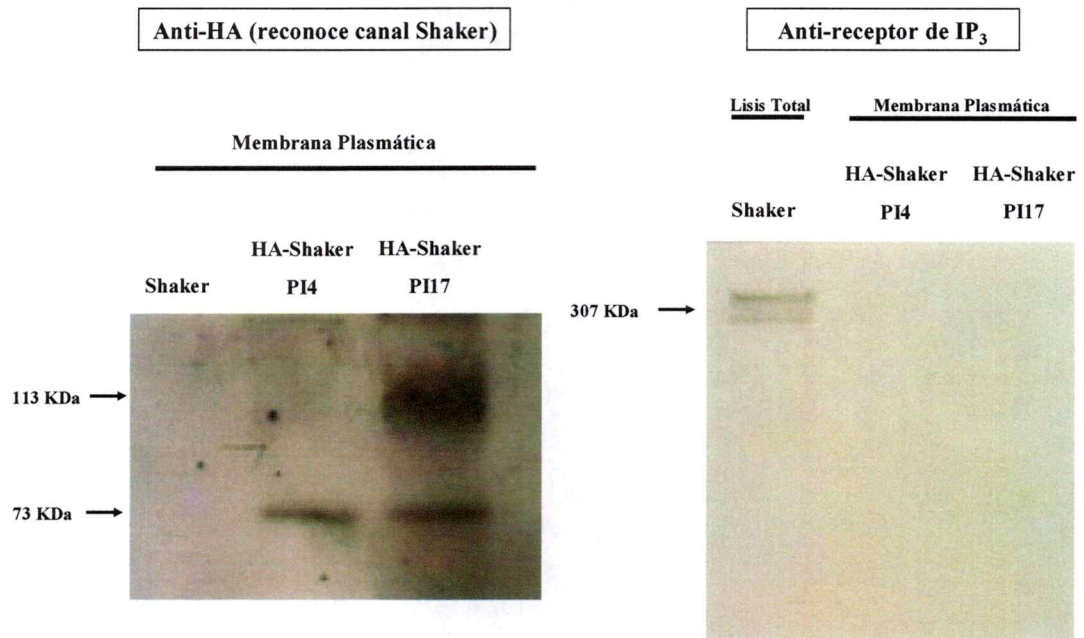


Figura 16. Formas del canal presentes en la MP. En la figura de la izquierda se muestra un Western Blot de ovocitos sometidos a un experimento de biotinización para obtener la fracción correspondiente a la MP de ovocitos arrestados y no arrestados. En este caso se utilizó un anticuerpo anti-HA que reconoce al canal. En la figura de la izquierda se utilizó un anticuerpo contra el IP₃R (Alomone), para verificar que las fracciones de MP no están contaminadas con restos de otros organelos. Como control positivo se utilizó una fracción de lisis total. Para ambos experimentos se utilizó como control un canal *Shaker* sin HA.

no es detectable. Estos resultados indican que, tanto en los ovocitos arrestados como en los controles, una proporción significativa de los canales de K^+ presentes en la MP contiene, o está formado por, subunidades inmaduras.

3.2.3 *Maduración del canal.*

Quisimos comparar los registros electrofisiológicos con los estadios de maduración del canal a través del tiempo. Para esto, a distintos intervalos después de terminado el arresto, se midió la corriente iónica de los ovocitos y se graficó su corriente vs el tiempo de incubación a temperatura ambiente post-arresto (Figura 17 A). Paralelamente los ovocitos fueron sometidos a biotinilización para obtener muestras de fracción total y MP. En la figura 17 se muestra las electroforesis correspondientes. Se observa, tanto en las muestras de lisis total como de MP, que en ovocitos sometidos a una hora de incubación a temperatura ambiente post-arresto se observa sólo la banda de ~73 kDa. Sólo a tiempos de incubación iguales o mayores a 3 horas se observa una contribución significativa de la banda de ~113 kDa correspondiente a la proteína madura (n=2).

El aumento de corriente en registros de más de una hora de duración, en los ovocitos arrestados, puede corresponder principalmente a canales inmaduros incorporándose en la MP. Recordemos que en los

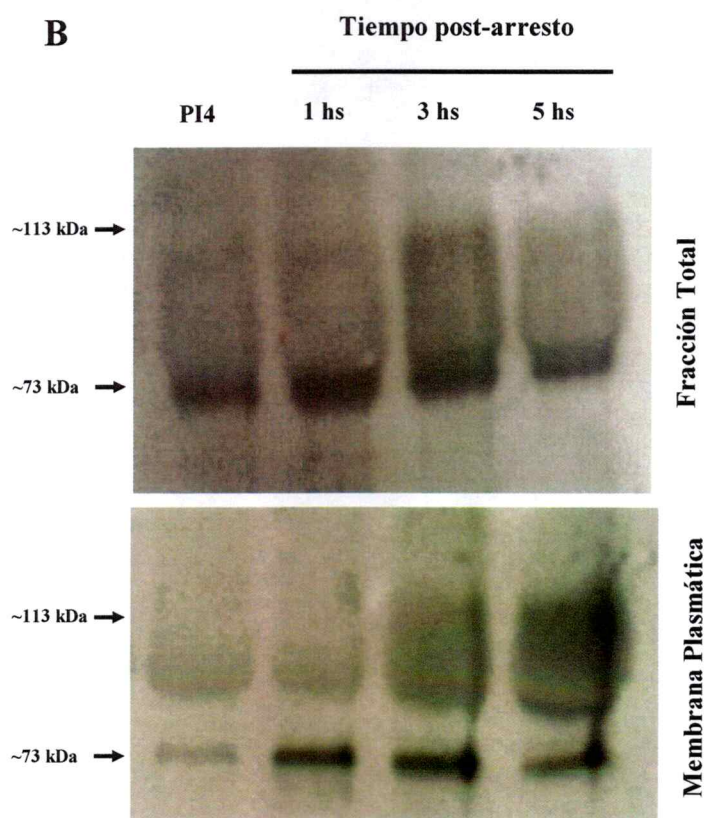
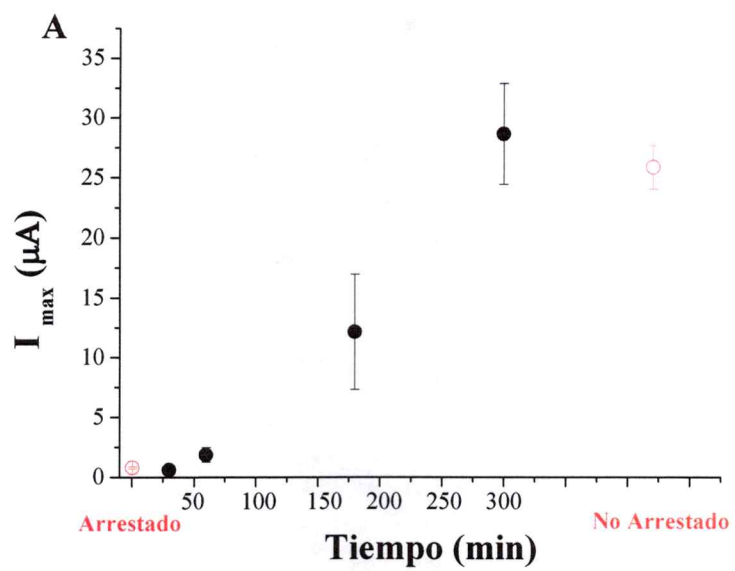


Figura 17. Aparición forma madura del canal en el tiempo. En A se muestra una curva corriente versus tiempo generada midiendo la corriente máxima de distintos grupos de ovocitos a diferentes tiempos post-arresto incubados a temperatura ambiente. En rojo se muestra la corriente medida en grupos de ovocitos no arrestados y arrestados. En B se presenta Western Blots utilizando muestras de lisis total, en la parte superior, y de MP, en la parte inferior, de ovocitos a diferentes tiempos post-arresto incubados a temperatura ambiente.

registros electrofisiológicos a la hora de registro (a temperatura ambiente) ya se observa un aumento de corriente de entre 3 a 20 veces.

Como control de este experimento, luego de incubar por 6 hs a 17°C, los ovocitos se pusieron a temperatura ambiente (~23°C) y se midió la corriente iónica a diferentes intervalos de tiempo después de esta maniobra. En la figura 18 A se observa el gráfico de corriente medida a varios intervalos de tiempo después de ponerlos a temperatura ambiente (n=4). Si bien se observa un aumento de la corriente casi al doble a la hora, posteriormente se mantiene casi constante. Si comparamos estos niveles de corriente con los registrados en los ovocitos a diferentes intervalos de tiempo post-arresto, observamos que a un mismo intervalo de tiempo el nivel de corriente es menor (aproximadamente la mitad a las 5 hs). En base a estos resultados podríamos especular que, durante el arresto, el tráfico de los canales hacia la MP no se ve impedido.

Paralelamente, una muestra de cada grupo fue sometida a biotinización para identificar las proteínas presentes en la MP (se usaron 4 muestras de fracción total y 3 de MP). La figura 18 B muestra los Western Blots correspondientes a esta medición. Tanto las muestras de lisis total como las de MP, muestran tanto la banda de ~73 kDa como la de ~113 kDa en todos los intervalos de tiempo. Esto implicaría que 6

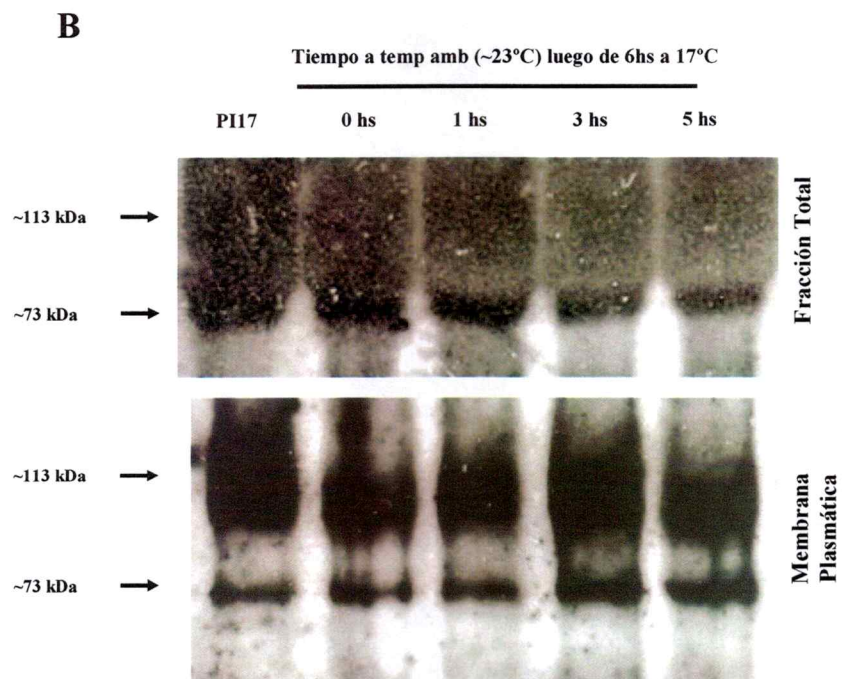
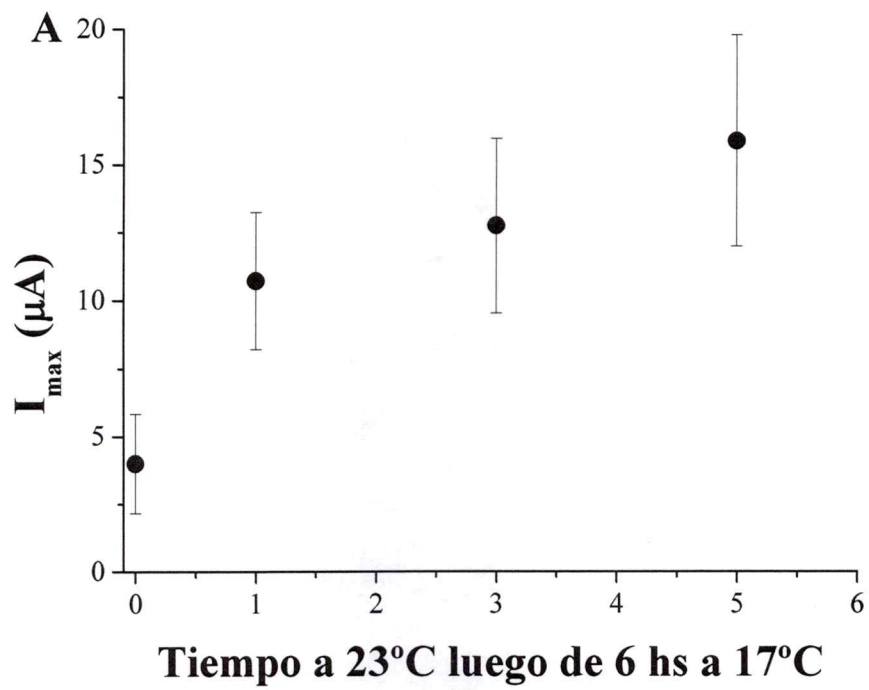


Figura 18. Curva temporal control. En A se muestra una curva corriente versus tiempo generada midiendo la corriente máxima de distintos grupos de ovocitos luego de diferentes intervalos de tiempo a temperatura ambiente a partir de terminada una incubación de 6hs a 17°C (temperatura de registro, ~23°C). En B se presenta Western Blots utilizando muestras de lisis total, en la parte superior, y de MP, en la parte inferior, de ovocitos a diferentes tiempos a temperatura ambiente luego de 6hs a 17°C.

horas posteriores a la inyección del cRNA, se expresan tanto especies maduras como inmaduras de la proteína, lo que se mantiene a través de las primeras 7 horas. Sin embargo debemos comentar las dificultades que se presentaron para realizar estos experimentos, ya que para que las bandas pudiesen ser detectadas debió exponerse a los Western blots por tiempos superiores a los utilizados en los otros experimentos, generándose un bandeo inespecífico que contamina la detección de las bandas correspondientes al canal.

Dado que los Western blot de ovocitos arrestados presentan principalmente la banda inmadura, estos resultados son sorprendentes, pues sugieren que el ovocito ha perdido una gran proporción de la proteína madura.

Sin embargo, no podemos descartar que el reclutamiento de canales observado electrofisiológicamente sea producido por una pequeña población del total de canales, que no es detectable por los experimentos bioquímicos utilizados que presentan un menor nivel de detección que los electrofisiológicos.

3.2.4 Efecto de la Brefeldina.

Si bien es conocido que la Brefeldina interrumpe el tráfico del RE al aparato de Golgi, y/o entre las cisternas de este último (Dinter y

Berger, 1998), decidimos realizar algunos experimentos que nos permitieran acordar su acción en los ovocitos de *Xenopus laevis*. La brefeldina bloquea reversiblemente el transporte vesicular anterógrado pues produce el desensamblaje del Aparato de Golgi (Klausner y col., 1992). La droga previene el ensamblaje de los caotómeros inhibiendo la interacción GTP-dependiente del ARF (Factor de ADP-Ribosilación) con la membrana del Golgi (Donaldson y col., 1992; Helms y Rothman, 1992). Se realizó un inmunomarcaje con muestras de proteínas purificadas de ovocitos sometidos a diferentes protocolos: ovocitos arrestados, ovocitos no arrestados, ovocitos incubados a 17°C por 6 horas, y continuando la incubación a 17°C en presencia de Brefeldina 10 µM y ovocitos incubados a 17°C en presencia de Brefeldina 10 µM desde el momento en que fueron inyectados.

En la Figura 19 se muestra una banda de ~73 kDa para los ovocitos arrestados; dos bandas de ~73 kDa y de ~113 kDa, para ovocitos no arrestados; una banda de ~73 kDa, para los ovocitos incubados en presencia de brefeldina tanto desde el momento de inyección del cRNA como 6 hs posterior a la misma (n=2). La similitud de los datos en presencia de brefeldina A con los resultados del arresto nos sugiere, que, como se ha publicado para otros tipos celulares, en ovocitos la brefeldina interrumpiría el tráfico del RE al aparato de Golgi,

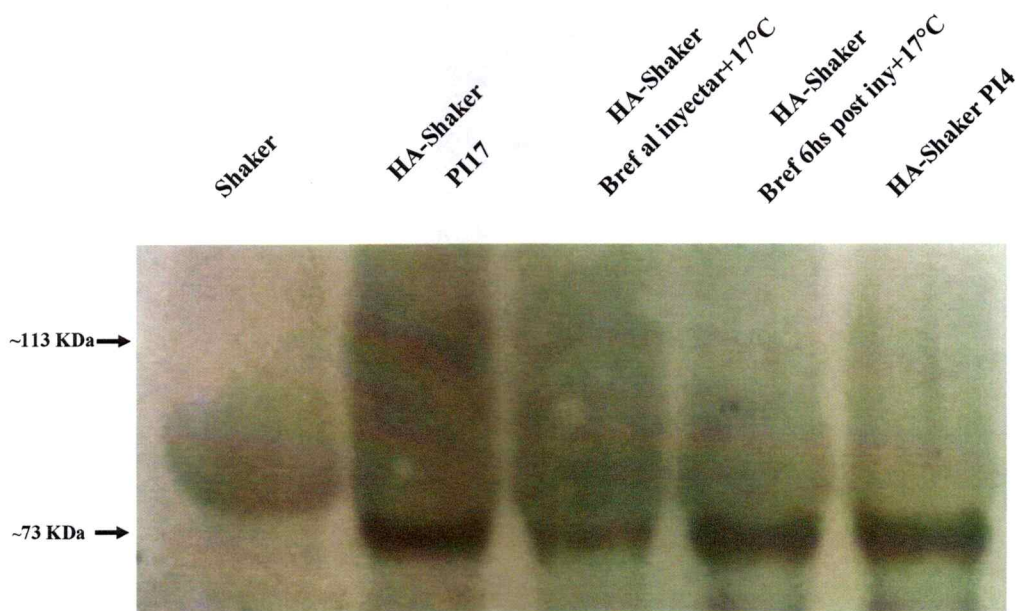


Figura 19. Efecto de la brefeldina. Se muestra un Western Blot de muestras de lisis total de ovocitos sometidos a diferentes protocolos: arresto, no arresto e incubados a 17°C por 6 horas y continuando la incubación a 17°C en presencia de Brefeldina 10 μ M . Como control se utilizó un Shaker sin HA.

y/o entre las cisternas de este último, impactando en la formación de la forma madura del canal. A su vez confirmaría que la forma inmadura corresponde a una estructura que usualmente se encuentra en el RE y la forma madura a una estructura que normalmente debe encontrarse a partir del aparato de Golgi.

Sin embargo, este resultado por si solo no es suficiente para concluir que la Brefeldina detiene el tráfico de los canales en el RE, pues, como vimos en las figuras 16 y 17, la forma inmadura también se puede encontrar en la MP. Por lo tanto, es necesario medir los niveles de expresión superficial en los ovocitos tratados con esta droga. Así, paralelamente se compararon los niveles de corriente total en ovocitos no arrestados y en arrestados con ovocitos incubados con brefeldina 10 μM al momento de la inyección de cRNA o luego de 6 hs posteriores a la inyección del cRNA e incubados el resto del tiempo a 17 °C.

La Figura 20 muestra que los niveles de corriente en los ovocitos incubados con la brefeldina son apenas detectables, sugiriendo que en efecto, en estas condiciones experimentales, esta droga interrumpe el tráfico de salida de los canales desde el RE.

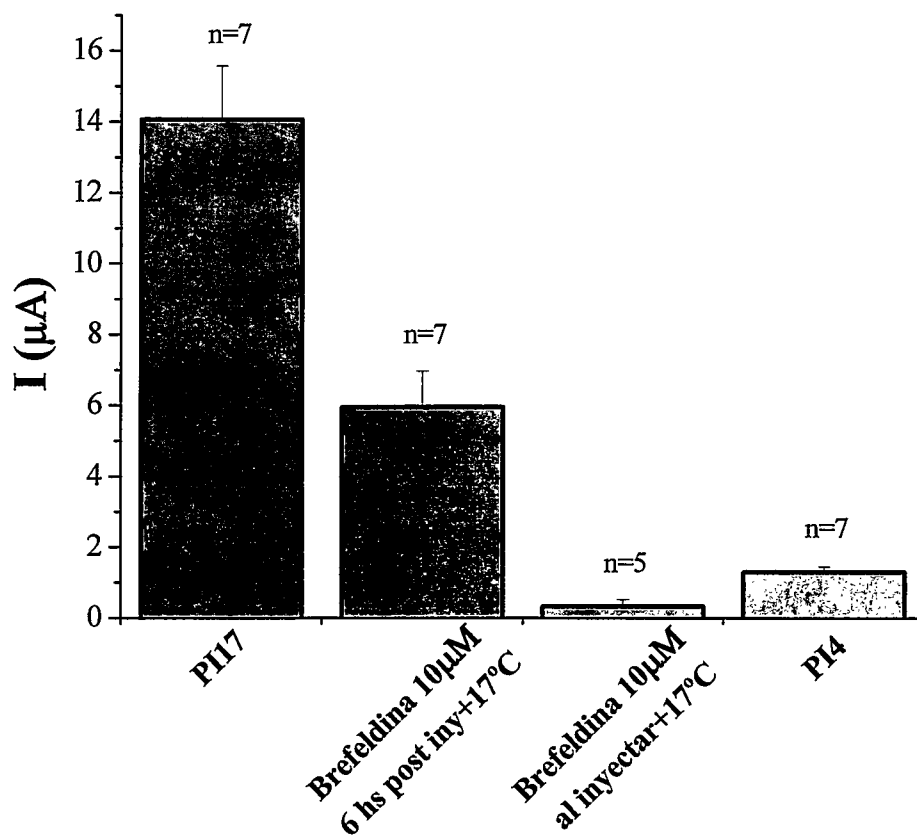


Figura 20. Efecto de la brefeldina sobre las corrientes. Niveles de corriente máxima, luego de un pulso despolarizante al llegar al equilibrio, en diferentes condiciones experimentales: arresto, no arresto y ovocitos incubados con brefeldina 10 μ M inmediatamente luego o 6 hs posterior a la inyección del cRNA e incubados el resto del tiempo a 17 °C. Los datos representan las medias \pm su error standard.

3.2.5 Identificación de las especies del canal en los diferentes compartimentos subcelulares.

Finalmente, se realizó un fraccionamiento subcelular como estrategia para detectar las formas del canal en los diferentes organelos subcelulares en ovocitos arrestados y no arrestados.

En la Figura 21 se muestran los Western Blots correspondientes a las diferentes fracciones recolectadas de un gradiente continuo de sacarosa (entre 0,6 y 2,0 M). Se utilizaron distintos anticuerpos para distinguir el canal y proteínas marcadoras de cada compartimento subcelular: anti- $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa para detectar las fracciones de MP, anti-PDI para las de RE y anti-p230 para las de TGN.

En primer lugar podemos observar que en los ovocitos PI17 la forma inmadura del canal es más abundante en las fracciones enriquecidas con RE, mientras que en las fracciones enriquecidas con TGN y MP se encuentran ambas formas. Estos datos concuerdan con lo descrito sobre el procesamiento de la glicosilación del canal en ovocitos de *Xenopus* (Santacruz-Tolosa, 1994).

En contraste, en los ovocitos PI4 se observa principalmente la forma inmadura del canal en todas las fracciones. Esto nos permite sugerir que, tanto en los ovocitos arrestados como en los controles, el canal inmaduro puede arribar a la MP sin sufrir ninguna modificación en

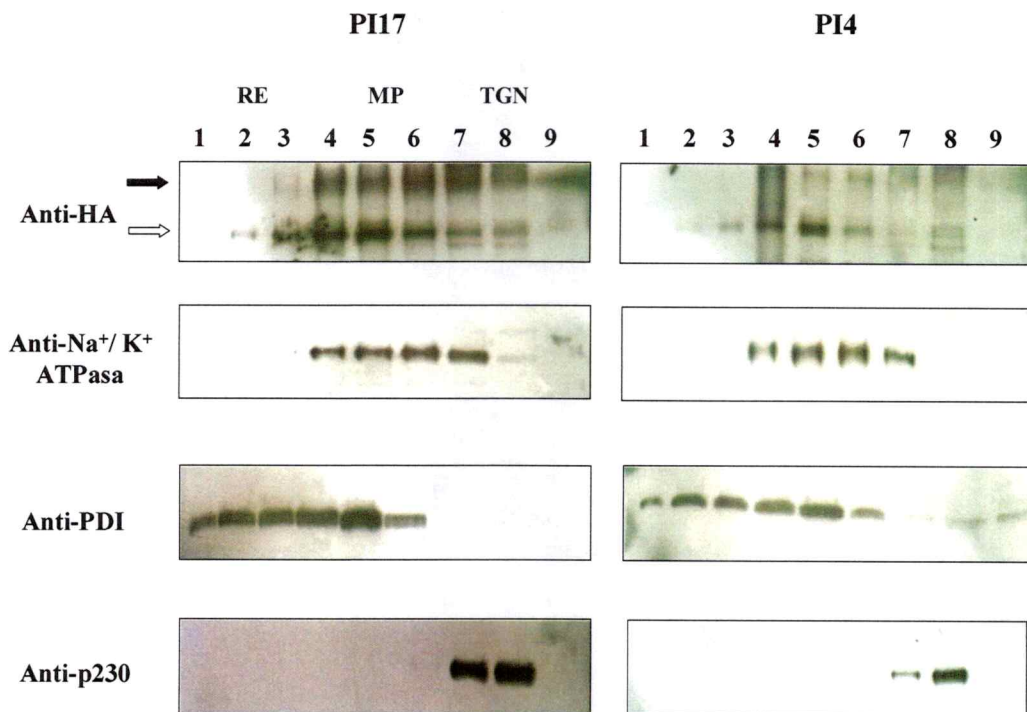


Figura 21. Formas del canal presentes en los diferentes organelos subcelulares. En la figura se muestran los Western Blots de ovocitos no arrestados (PI17) y arrestados (PI4) ($n=2$). En este caso se utilizó un anticuerpo anti-HA que reconoce al canal; un anticuerpo anti- $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ como marcador de MP; un anticuerpo anti-PDI como marcador de RE y un anticuerpo anti-p230 como marcador de TGN. La muestra 1 corresponde a las fracciones de sacarosa mas concentrada (~ 2 M). En el inmunoblot correspondiente al anti-HA, la flecha negra indica la forma madura del canal y la flecha blanca la forma inmadura del canal.

sus ramificaciones de azúcares.

Con estos datos proponemos que la corriente registrada en los ovocitos no arrestados procede mayoritariamente de canales glicosilados, mientras que la registrada inmediatamente luego de sacar los ovocitos del arresto, proviene de canales parcialmente glicosilados en el RE.

DISCUSIÓN

Si bien la exocitosis constitutiva opera en todas las células eucariotas, el desconocimiento de un factor desencadenante que la active, como en la exocitosis regulada, hace difícil abordar su estudio. En nuestro laboratorio hemos desarrollado una estrategia experimental que nos permite estudiar la exocitosis constitutiva de una proteína de membrana (el canal de K^+ tipo *Shaker*) en tiempo real y en un modelo experimental con amplias ventajas de manipulación, como es el ovocito de *Xenopus laevis*. La medición de la variación de la corriente iónica en el tiempo es un instrumento que nos permite comprobar, en forma indirecta, la aparición de canales funcionales en la MP debida probablemente a la fusión de vesículas conteniendo nuevos canales.

La maniobra experimental consistente en incubar a 4°C por 16 hs nos permitió “arrestar” el tráfico de los canales en alguna de las etapas finales de su tránsito a la MP. Al retorno a temperatura ambiente, observamos un aumento de la corriente iónica debida a la incorporación de canales “frescos” a la MP. Mostramos esto último modificando químicamente (y dejando no-funcionales) a canales previamente

expuestos a la membrana externa y observando la aparición de nuevos canales funcionales (ver datos preliminares).

Diferencias en la sensibilidad a BAPTA y EGTA (ver datos preliminares), sugieren que el reclutamiento de canales depende del Ca^{2+} intracelular espacialmente localizado. En cambio, este reclutamiento es independiente del Ca^{2+} extracelular. El Ca^{2+} intracelular necesario para el reclutamiento procede de un reservorio sensible a heparina que además debe hallarse repleto de Ca^{2+} , ya que la Tapsigargina inhibe el transporte de los canales a la MP.

Participación del IP_3R en el proceso de tráfico proteico.

En este trabajo nos planteamos, como primer objetivo, demostrar que el Ca^{2+} intracelular que interviene en este proceso proviene del RE a través de IP_3R .

Los experimentos en que bloqueamos directamente los IP_3R con un anticuerpo específico o a través de un antagonista del IP_3R , nos indicaron que los IP_3R están involucrados en el transporte de los canales a la MP, probablemente regulando la salida del Ca^{2+} desde el RE.

Dado que el IP_3R está implicado en este fenómeno, variaciones en los niveles de IP_3 en los ovocitos podrían estar modulando su activación y por lo tanto el proceso de inserción de los canales.

La medición de la concentración de IP_3 en ovocitos, sometidos a cada uno de los protocolos, nos muestra que los ovocitos arrestados (PI4) contienen una concentración de IP_3 cuatro veces mayor a la de los no arrestados (PI17). Posiblemente, a $4^\circ C$, las enzimas encargadas de la degradación del IP_3 están inhibidas. Si consideramos que el valor basal medido en ovocitos es aproximadamente 40 nM (Luzzi y col., 1998), podríamos especular sobre el fenómeno observado.

Por un lado, podríamos pensar que al retirarlos del arresto, los ovocitos contienen un nivel de IP_3 elevado que permite la actividad de los IP_3R y por lo tanto la liberación de Ca^{2+} desde el RE. Este Ca^{2+} es el que participaría en la inserción de los nuevos canales a la MP, detectada como un aumento de la corriente iónica. En contraposición con esta especulación, si consideramos la regulación bifásica de la apertura del IP_3R por Ca^{2+} (Foskett y col, 2007), podríamos teorizar que, en los ovocitos arrestados con altos niveles de IP_3 , estos receptores estarían inhibidos. Los ovocitos arrestados tendrían niveles de IP_3 que generarían una liberación de Ca^{2+} que, en un primer momento, colaborarían con la liberación del catión, pero que, a concentraciones mayores de Ca^{2+} , actuarían inhibiendo los IP_3R . Al retirar a los ovocitos del arresto, las enzimas que degradan IP_3 podrían reactivarse, degradando IP_3 hasta bajar su concentración a los niveles basales, reduciendo la inhibición de

los receptores, y estos liberan el Ca^{2+} necesario para el tráfico de los canales a MP. Paralelamente, el menor nivel de IP_3 de los ovocitos no arrestados permitiría mantener la cantidad de canales en membrana que generan el nivel de corriente constante.

Por lo anteriormente expuesto, variaciones en la concentración de IP_3 en los ovocitos podría afectar el tráfico de canales lo que debería detectarse como una variación en la pendiente de la curva corriente versus tiempo. A pesar de que el aumento de los niveles de IP_3 por sobre 500 nM, no modificó las curvas como se esperaba (Figura 10), la utilización de un inhibidor de PLC, para reducir los niveles de IP_3 , produjo una disminución de la corriente. Estos datos nos muestran que la disminución de la producción de IP_3 interrumpe el proceso de tráfico proteico hacia la membrana plasmática y posiblemente aumenta la tasa de endocitosis, mientras que un aumento en las concentraciones de IP_3 no afecta el proceso.

Con estos antecedentes podríamos confirmar, no solo la participación de los IP_3R en este proceso, sino también la necesidad de un cierto margen de concentración de IP_3 para la activación de los mismos. El que las inyecciones de IP_3 no aceleren este transporte, nos permitiría especular que este proceso proceda a niveles basales de IP_3 presentes en el ovocito.

En el ovocito de *Xenopus* se han reportado dos constantes de disociación diferentes para el receptor de IP₃: 5 y 46 nM (Callamaras y Parker, 1994; Parys y col., 1992). La concentración basal medida de IP₃ de 40 nM sugiere que, en un ovocito en reposo, los sitios de unión a IP₃, de mayor afinidad deberían estar, en gran medida, ocupados en un ovocito en reposo. A su vez debemos considerar que el IP₃ es débilmente tamponado, es decir la concentración citosólica de IP₃ es aproximadamente igual a la concentración de IP₃ libre (Allbritton y col., 1992; Gromada y col., 1993). Si consideramos los valores de IP₃ medidos tanto para ovocitos arrestados como para los no arrestados, una fracción importante de los receptores con ambas constantes de disociación estarían ocupados o en su defecto inhibidos por altas concentraciones de Ca²⁺. Así es posible que nuestra incapacidad de aumentar la velocidad de reclutamiento de canales a la membrana mediante inyecciones de IP₃, se deba a que la población de receptores involucrados en la inserción de canales se encuentre operando a su capacidad máxima o se encuentren parcial o totalmente inhibidos.

Mediante imágenes de fluorescencia en ovocitos, se ha observado que el IP₃ libera Ca²⁺ en sitios discretos, eventos que duran cientos de milisegundos y se restringen unos pocos micrómetros (Parker y Yao, 1991). A estas señales transitorias de Ca²⁺ se las denomina “*puffs*”. Las

amplitudes de estos *puffs* muestran una característica todo o nada, mientras que su frecuencia se incrementa abruptamente con concentraciones crecientes de IP_3 (Yao, 1995). Estos *puffs* corresponderían a la activación concertada y simultánea de un grupo de receptores organizados dentro de un *cluster*, espacialmente cercanos, lo que provoca que su propagación esté restringida espacialmente (Foskett y col., 2007).

Así, la ausencia de efecto de las inyecciones de IP_3 y el efecto diferencial de los quelantes de Ca^{2+} , son consistentes con la idea de que la inserción de canales a la MP corresponde a la actividad de un grupo de IP_3R , espacialmente localizados, que se encuentran funcionando al tope de su capacidad, como la producida en los *puffs* de Ca^{2+} .

Esta explicación permitiría justificar que la exocitosis constitutiva sea insensible a las inyecciones de IP_3 y ocurra a niveles de reposo de Ca^{2+} intracelular.

Identificación del compartimiento subcelular en el cual quedan arrestados los canales.

Utilizando la capacidad de poder diferenciar las dos formas de glicosilación del canal mediante la técnica de Western Blot, se identificaron electroforéticamente las especies presentes en cada uno de los protocolos de temperatura de incubación. Los ovocitos no arrestados

presentan una banda de ~73 kDa, correspondiente a la forma inmadura del canal, y otra de ~113 kDa, correspondiente a la forma madura. Estos resultados concuerdan con la bibliografía preliminar (Santacruz-Tolosa y col., 1994). En cambio en los ovocitos arrestados, se observó predominantemente la banda de ~73 kDa. Los experimentos con Endo-H, nos permitieron confirmar que esta banda, presente principalmente en los ovocitos arrestados, corresponde a una forma del canal normalmente hallada a nivel del RE (consistente con los resultados de los experimentos de Western blot con brefeldina; Figura 19). Este tipo de resultados se repite tanto en las muestras de lisis total de ovocitos (que por lo tanto representan los canales presentes en toda la célula), como en las muestras biotiniladas que corresponden mayoritariamente a los canales presentes en la MP. Por lo tanto, los ovocitos arrestados presentan en su membrana esencialmente la forma inmadura del canal, mientras que los ovocitos no arrestados presentan mayoritariamente, aunque no exclusivamente, la forma madura del canal. Estos resultados sugieren que la corriente registrada en los ovocitos no arrestados procede mayoritariamente de canales maduros, mientras que la registrada inmediatamente al arresto, proviene de canales parcialmente glicosilados.

Estas ideas concuerdan con los resultados de los experimentos de fraccionamiento subcelular (Figura 21). Para los ovocitos arrestados observamos mayoritariamente la presencia de la banda de menor peso molecular en todas las fracciones, mientras que para los ovocitos no arrestados las bandas que aparecen en las diferentes fracciones son consistentes con el proceso de maduración del canal a medida que avanza entre los distintos compartimientos subcelulares.

Los niveles comparables de corriente entre los ovocitos 6 horas posterior a la inyección del cRNA e incubados a 17°C y en los ovocitos luego de ser sometidos al protocolo PI4, nos permitirían sugerir que al momento de sacar los ovocitos del arresto, los canales presentes en la membrana, sean solamente aquellos que pudieron llegar a la membrana en las primeras 6 horas posteriores a la inyección de cRNA (Figura 14). Sin embargo, la detección de ambas especies del canal en la MP ya en las primeras 6 horas post inyección, es inconsistente con esta conclusión (Figura 18). Así, podemos especular que al instante de comenzar el arresto, los ovocitos ya poseen en la MP ambas especies del canal y, que durante las aproximadamente 17 hs de incubación a 4°C, se produciría una endocitosis tanto de los canales maduros como de los inmaduros. En este período el proceso de maduración se detiene, sin embargo, el tráfico anterógrado no se interrumpe, acumulando proteína inmadura en la

vecindad de la MP. Al momento de retirar del arresto, los ovocitos reclutarían principalmente la forma de ~73 kDa del canal en su MP.

Paralelamente, comparamos los niveles de corriente, y las especies presentes, en ovocitos incubados a temperatura ambiente durante diferentes intervalos de tiempo luego del arresto. Los niveles de corriente aumentan en el tiempo, mientras que solo luego de 3 hs se puede apreciar la aparición de la banda del canal maduro en muestras de lisis total y de MP de ovocitos.

Los ovocitos arrestados presentan mayoritariamente en la MP una forma de *Shaker* parcialmente glicosilada en el RE. Sin embargo, el tráfico a la MP de esta especie no es interrumpido por brefeldina, lo que nos indicaría que el arresto acumula a los canales en un compartimiento río abajo del Golgi, posiblemente el TGN. Con estos datos podemos proponer dos modelos para explicar la presencia de canales inmaduros en la membrana plasmática: a) los canales transitan directamente desde el RE a la MP o b) una fracción de los canales parcialmente glicosilados transitan por el Aparato de Golgi hacia la MP sin sufrir más modificaciones a sus ramificaciones de azúcares.

Los antecedentes presentes en la literatura, nos muestran diferencias en la localización del mutante de glicosilación del canal de agua aquoporina 2 según el modelo experimental utilizado: esta proteína

se expresa en la MP de ovocitos de *Xenopus laevis* pero queda retenida en el RE en células de mamíferos (Hendriks y col., 2004). Esto concuerda con el fenómeno general que la reducción de temperatura en células de mamíferos incrementa la expresión en la superficie celular de proteínas con defectos en su glicosilación. Por ejemplo, la proteína G no glicosilada del VSV (virus de la estomatitis vesicular) es detectada en la superficie celular cuando las células BHK-1 son incubadas a 30°C pero no cuando son incubadas a 37°C (Gibson y col., 1978). A su vez la reducción de temperatura no solo incrementa la expresión superficial del mutante de tráfico del canal de cloruro CFTR ($\Delta F508$ CFTR), sino que aumenta el tráfico de proteínas inmaduras a la MP (Kwon y col., 2007).

Estos antecedentes nos permiten postular que durante el arresto por temperatura, los canales quedan retenidos en su tráfico a la MP. Una vez terminado el protocolo de enfriamiento, podemos postular dos modelos (Figura 22):

a) los canales transitan desde el RE, donde recibieron su primera etapa de glicosilación, hacia la MP saltándose el paso por el Aparato de Golgi. Este proceso es regulado por el Ca^{2+} proveniente desde el RE a través del IP_3R , a los niveles basales de IP_3 presentes en el ovocito (Figura 22 A). Este proceso se vería beneficiado por la cercanía entre el

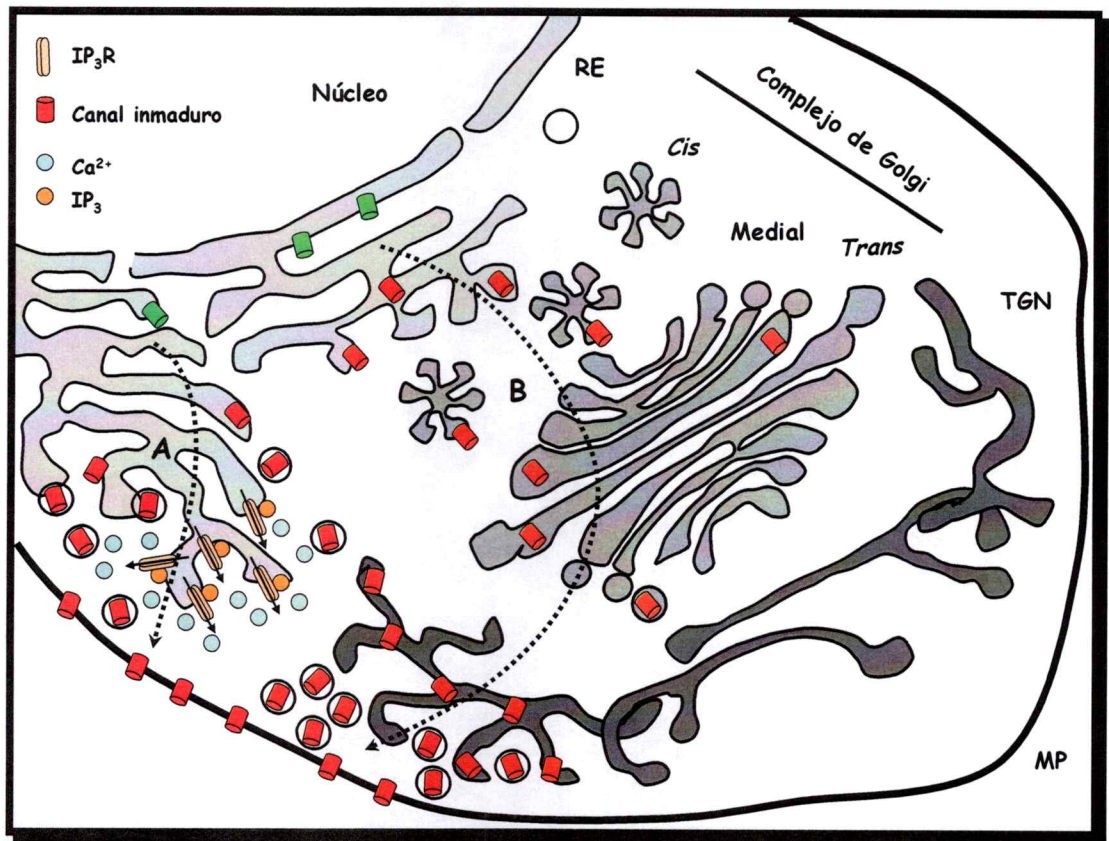


Figura 22. Modelo propuesto para el transporte de los canales de K⁺ tipos Shaker a MP. Descripción en el texto principal.

RE y la MP observada en los ovocitos (Zampighi y col, 1999). Transcurrido un tiempo superior a la hora, se hace evidente que los canales transitarían hacia la MP por su vía usual: RE, Aparato de Golgi y MP, lo que permite observar la forma madura de la proteína en la MP.

b) los canales, acumulados durante el arresto en la cercanía de la MP, posiblemente el TGN, comienzan a llegar a la MP a través de un proceso regulado por el Ca^{2+} proveniente desde el RE a través del IP_3R , a los niveles basales de IP_3 presentes en el ovocito. Los canales transitan hacia la MP atravesando el RE, donde reciben su primera etapa de glicosilación. Posteriormente pasan a través del Aparato de Golgi sin sufrir modificación en sus azúcares, posiblemente debido a algún efecto de la temperatura sobre las enzimas responsables de esta tarea (Figura 22 B). Según nos indican nuestros datos, el efecto de reactivar estas enzimas tardaría un período de tiempo superior a la hora en ser detectado. Este tráfico de proteínas parcialmente maduras a través del Golgi, estaría posibilitado por la falta de mecanismos de control en este compartimiento, los cuales si están presentes en el RE (Helenius y col 2001).

Así, es posible que en los animales poiquiloterms el grado final de glicosilación de ciertas proteínas de membrana estaría determinado

por la temperatura ambiental y ésta podría representar una vía alternativa para renovar proteínas de membrana aún a temperaturas bajas.

CONCLUSIONES

La maniobra experimental que hemos desarrollado nos permitió “arrestar” el tráfico del canal de K^+ tipo *Shaker* en alguna de las etapas finales de su traslado a la membrana plasmática.

El transporte de los canales, una vez retirados del arresto, depende de una señal de calcio citosólico espacialmente localizada. Este aumento transitorio de calcio intracelular es procedente del retículo endoplásmico a través de los receptores de IP_3 . La salida del calcio desde el reservorio intracelular es regulada por el IP_3 y se produce a niveles basales de este mensajero.

Puesto que los canales reclutados a la membrana plasmática están parcialmente glicosilados y su transporte es insensible a brefeldina, proponemos que estas proteínas se encuentran arrestadas en un compartimiento intracelular:

a) como el retículo endoplasmático, y que se allí transita hacia la MP, sin pasar por el Aparato de Golgi,

b) posterior al Golgi medial, pero que han escapado a la maquinaria de glicosilación de este organelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (1998) *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York and London: Garland Science; c2002
- Aleu J, Blasi J, Solsona C and Marsal J (2002) Calcium-dependent acetylcholine release from *Xenopus* oocytes: simultaneous ionic currents and acetylcholine release recordings. *Eur. J. Neurosc.* 16: 1442-1448.
- Allbritton NL, Meyer T and Stryer L (1992) Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 258: 1812-1815.
- Andreose JS, Fumagalli G, Sigworth FJ and Caplan MJ (1996) Real-time detection of the surface delivery of newly synthesized membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7661-7666.
- Bezprovanny IB, Ondrias K, Kaftan E, Stoyanosky DA and Ehrlich BE (1993) Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and another polyanions is calcium dependent. *Mol. Biol. Cell.* 4: 347-352.
- Brecht DS, Mourey RJ and Snyder SH (1989) A simple, sensitive and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5-trisphosphate in biological tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 976-982.
- Callamaras N and Parker I (1994) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in *Xenopus laevis* oocytes: localization and modulation by Ca^{2+} . *Cell Calcium* 15: 60-72
- Chapman, ER (2002) Synaptotagmin: A Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis?. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 1-11.
- Chen, YA and Scheller, RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 98-106.
- Chorna-Ornan I, Almagor TJ, Ben-Ami HC, Frechter S, Gillo B, Selinger Z, Gill DL, and Minke B (2001) A Common Mechanism

Underlies Vertebrate Calcium Signaling and *Drosophila* Phototransduction. J. of Neurosc. 21: 2622-2629.

- Cohen SN, Chang ACY and Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114.
- De Blas G, Michaut M, Treviño CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A and Mayorga LS (2002) The intracrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. J. Biol. Chem. 277: 49326-49331
- Dinter A and Berger EG. (1998) Golgi-disturbing agents. Histochem. Cell. Biol. 109: 571-590.
- Donaldson JG, Finaul D and Klausner RD (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. Nature 360: 350-352.
- Dulubova I, Yamaguchi T, Arac D, Hurveva I, Min SW, Rizo J, and Sudhof TC (2003) Convergence and divergences in the mechanism of SNARE binding by Sec1/Munc18-like proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 32-37.
- Fernández-Chacón F, Königstorfer S, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund D and Sudhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. Nature 410: 41-49.
- Foskett JK, White C, Cheung K-H and Mak D-O (2007) Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. Physiol. Rev. 87: 593-658.
- Gibson R, Schlesinger S and Kornfeld S (1979) The Nonglycosylated Glycoprotein of vesicular Stomatitis Virus is temperature-sensitive and Undergoes Intracellular Aggregation at Elevated Temperatures. J. Biol. Chem. 254: 3600-3607
- Gromada J, Jørgensen T D, Tritsarlis K, Nauntofte B and Dissing S (1993) Ca^{2+} signalling in exocrine acinar cells: the diffusional properties of cellular inositol 1,4,5-trisphosphate and its role in the release of Ca^{2+} . Cell Calcium 14: 711-23
- Han J-K and Nuccitelli R (1990) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release in the organelle layers of the stratified, intact egg of *Xenopus laevis*. J. Cell Biol. 110: 1103-1110.

- Helenius A and Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364–2369
- Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BWM, Oorschot V, Klumperman J, Deen PMT and van der Sluijs P (2004) Glycosilation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2, but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279: 2975-2983.
- Hille B (1992) Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed., Sinauer, Sunderland, MA.
- Hu SH, Latham CF, Gee CI, James DE and Martin JL (2007) Structure of the Mun18c/Syntaxin4 N-peptide complex defines universal features of the N-peptide binding mode of Sec1/Mun18 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8773-8778.
- Katz B and Miledi R (1967) The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol.* 189: 535-544
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992) *J. Cell Biol.* 116: 1071–1080
- Kwon SH, Pollard H and Guggino WB (2007) Knockdown of NHERF1 enhances degradation of temperature rescued DeltaF508 CFTR from the cell surface of human airway cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 20: 763-772.
- Liu Y, Jurman ME and Yellen G (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron.* 16: 859-867.
- Luzzi V, Sims CE, Soughayer JS, and Allbritton NL (1998) The Physiologic Concentration of Inositol 1,4,5-Trisphosphate in the Oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 273: 28657-28662
- MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350: 232-235.
- Maley F, Trimble RB, Tarentino AL and Plummer, TH (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry* 180: 195-204.
- Masui Y and Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes, *J. Exp. Zool* 177 pp. 129–146.

- Matlin KS and Simons K (1983) Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* 34: 233-43.
- Mayer A. (2001) What drives membrane fusion in eukaryotes?. *Trends. Biochem. Sci.* 26: 717-723.
- Mellman I and Warren G (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100: 99-112.
- Naranjo, D (1997) Assembly of Shaker K-channels from random mixture of subunits carrying different mutations. In: *From ion-channels cell-to-cell conversation* (Eds R Latorre and JC Saez). Plenum Press, NY Pp. 35-46.
- Palade GE (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 89: 347-358,
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Timpe LC and Jan LY (1988) Ion channels in *Drosophila*. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 379-394.
- Park H, Kim M, Shim S, Han J (1998) Identification and Expression Study of a *Xenopus* Homologue of Prenylated SNARE Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 235-239.
- Parker I and Yao Y (1991) Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. R. Soc. Lond. B* 246: 269-274
- Parys JB, McPherson SM, Mathews L, Campbell KP and Longo FJ (1994) Presence of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, calreticulin, and calsequestrin in eggs of sea urchins and *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 161: 466-76.
- Parys JB, Sernett SW, DeLisle S, Snyder PM, Welsh MJ, and Campbell, KP (1992) Isolation, Characterization, and Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Protein in *Xenopus laevis* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 18776-18782.
- Pinto P, Pozzan T and Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *The EMBO J.* 17: 5298-5308.
- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Canal HH, Llamazares S, and Ferrus A. (1988) *Shaker* encodes

a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. EMBO J. 7: 1087-1096.

- Ponnambalam S and Baldwin SA (2003) Constitutive protein secretion from the trans-golgi network to the plasma membrane. Mol. Membr. Biol. 20: 129-139.
- Rothman JE. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 372: 55-63.
- Rothman, J.E., and Orci, L.E. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. Nature 355: 409-415.
- Runft L, Watras J and Jaffe L (1999) Calcium release at fertilization of *Xenopus laevis* eggs requires type I IP₃ receptors, but not SH2 domain-mediated activation of PLC γ or Gq-mediated activation of PLC β . Dev. Biol. 214: 399-411.
- Santacruz-Toloza, L, Huang Y, John SA and Papazian DM (1994) Glycosilation of Shaker Potassium Channel Protein in Insect Cell Culture and in *Xenopus* Oocytes. Biochemistry 33: 5607-5613.
- Schmoranzer J, Goulian M, Axelrod D, and Simon SM (2000) Imaging Constitutive Exocytosis with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. J. Cell Biol. 149: 23-32
- Sebastian R, Díaz ME, Ayala G, Letinic K, Moncho-Bogani J and Toomre D (2006) Spatio-Temporal Analysis of Constitutive Exocytosis in Epithelial Cells. IEE/ACM TCBB 3: 17-32.
- Steele DF, Eldstrom J and Fedida D (2007) Mechanisms of cardiac potassium channel trafficking. J Physiol 582: 17-26.
- Sun J, Pang ZP, Qin D, Fahim AT, Adachi R and Sudhof TC (2007) A dual-calcium sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. Nature 450: 676-682
- Toomre D, Steyer JA, Keller P, Almers W and Simons K (2000) Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. J. Cell. Biol. 149: 33-40.
- Torres-Salazar D, Neely A and Naranjo D (2002) Calcium dependent increase of ionic currents due to recruitment of K⁺ channels into the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. Abstract published in 46th Annual Meeting of Biophysical Society.

Biophysical Journal.

- Wickner W and Haas A (2000) Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 247–275
- Yao Y, Choi J and Parker I (1995) Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 482: 533-553
- Zampighi GA, Loo DD, Kreman M, Eskandari S and Wright EM. (1999) Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 113: 507-24.

ANEXOS

ANEXO I. *Aumento del número de canales funcionales en la MP del ovocito.*

Se inyectaron ovocitos con el cRNA que codifica para el canal, se incubaron por un lapso de 6 hs a 17°C y luego a 4°C por toda la noche. Se denominó a este procedimiento “Protocolo de Incubación a 4°C” (PI4). Como consideramos que la exposición de los ovocitos a esta temperatura produce una detención del tráfico de esta proteína a la MP, denominamos a estos ovocitos “arrestados”. Como control se utilizaron ovocitos que fueron incubados por todo el tiempo a 17°C (“Protocolo de Incubación Normal” (PI17)). Los ovocitos fueron puestos a temperatura ambiente para medir la expresión de canales con la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Two-Electrode Voltage-Clamp, TEVC). El aumento del número de canales *Shaker* funcionales en la MP se midió como el aumento de la corriente iónica. En los ovocitos “arrestados” se observó un aumento de 3 a 20 veces en la corriente (n=7), mientras que en los ovocitos “no arrestados” se mantuvo constante durante el tiempo de registro (n=3). El incremento de la corriente no puede ser explicado como una polarización de los electrodos ni como un cambio en la fuerza

electromotriz del K^+ . En el primer caso se esperaba un notorio aumento en la cinética de activación de los canales a medida que la corriente es mayor. En el segundo caso se esperaba el aumento, de al menos, al doble en la concentración intracelular de K^+ . Esto es poco probable pues los ovocitos están bajo perfusión continua, y presumiblemente la composición iónica es constante. Considerando que el K^+ es el ión intracelular más abundante, tal cambio de concentración repercutiría enormemente en la tonicidad y/o volumen celular. Sin embargo, no hemos detectado ni encogimiento ni ensanchamiento en los ovocitos.

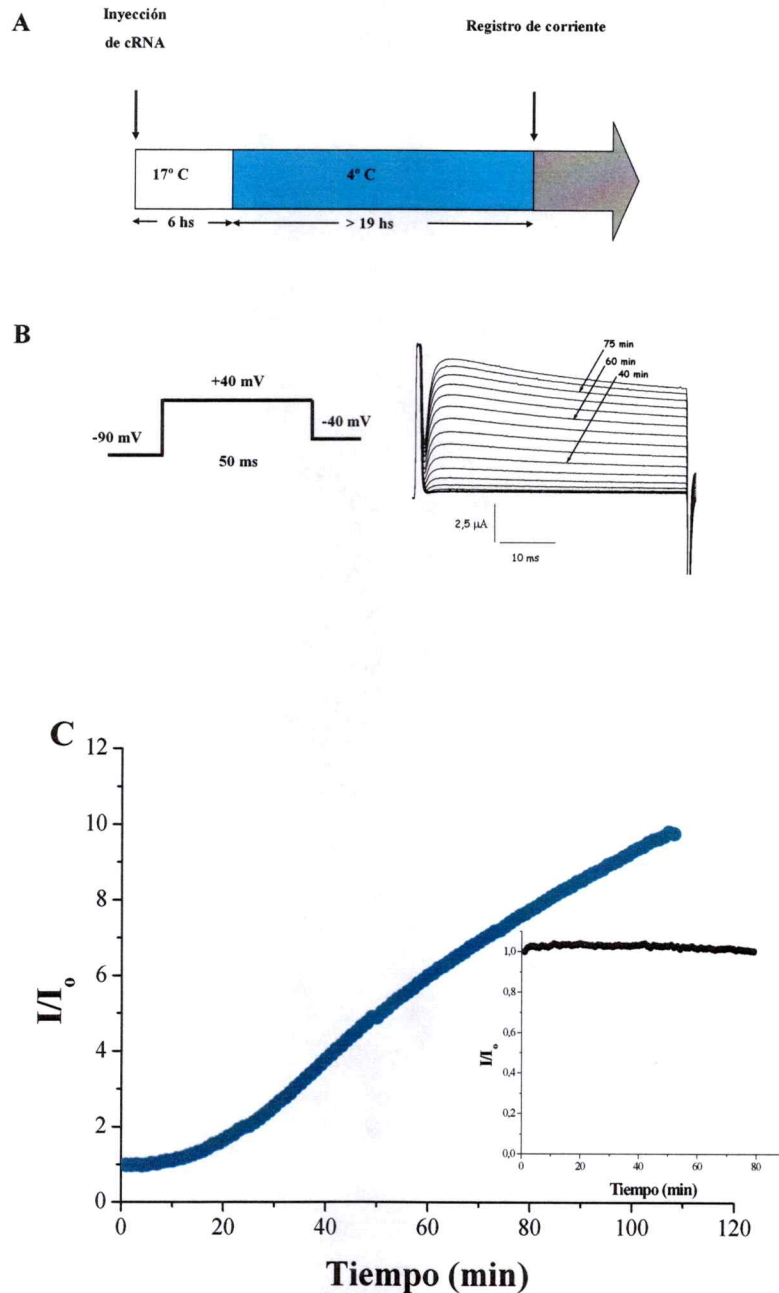


Figura 23. En ovocitos arrestados, la corriente de K^+ aumenta de 3 a 20 veces de su valor inicial durante la primera hora de registro. A) Protocolo de incubación a 4°C (PI4). B) Protocolo de pulso cuadrado de voltaje de 50 ms a +40 mV, aplicado cada un minuto para detectar el comportamiento de la amplitud máxima de la corriente en el tiempo y una selección de trazos donde se observa como va aumentando la corriente. C) Curva corriente vs tiempo en un ovocito posterior a ser sometido a protocolo PI4. En el inserto se muestra la curva corriente vs tiempo en un ovocito sometido al protocolo PI17.

ANEXO II. *El aumento de la corriente resulta del reclutamiento de nuevos canales en la MP.*

Se implantó una estrategia para alterar solo los canales presentes en la MP haciéndolos no-funcionales. Así cualquier aumento de corriente posterior a la modificación química se debe a canales que no estaban expuestos al medio de perfusión. Inyectamos cRNA de *Shaker* P450C en proporción 1:1 con el de *Shaker* silvestre. La mutación P450C introduce una cisteína que flanquea al poro de conducción iónica cuyos homotetrámeros no son funcionales (Liu, 1996). De esta coinyección, al menos cuatro poblaciones de tetrámeros funcionales se esperan teóricamente, conteniendo 0, 1, 2 o 3 subunidades mutadas (Naranjo, 1997). Luego de la inyección del cRNA, los ovocitos fueron incubados en presencia de ditioneitol (DTT) para mantener las cisternas en estado reducido a partir del momento de síntesis proteica. Los ovocitos fueron puestos en la cámara de registro para ser expuestos a Metano-tiosulfonato de etil-trietilamina (MTSET), un agente modificador de tioles expuestos al medio acuoso. La modificación de la cisteína introducida convierte en no-funcionales a todos los heterotetrameros que contengan al menos una subunidad mutante P450C. En cada una de las dos aplicaciones, este compuesto eliminó >60% de la corriente, dejando una fracción resistente, probablemente homotetrámeros de *Shaker* silvestre. La perfusión con

DTT al final del registro restaura el estado reducido de las cisteínas modificadas, recuperando una cantidad de canales que equivale aproximadamente a la suma de la corriente eliminada en cada una de las dos aplicaciones de MTSET.

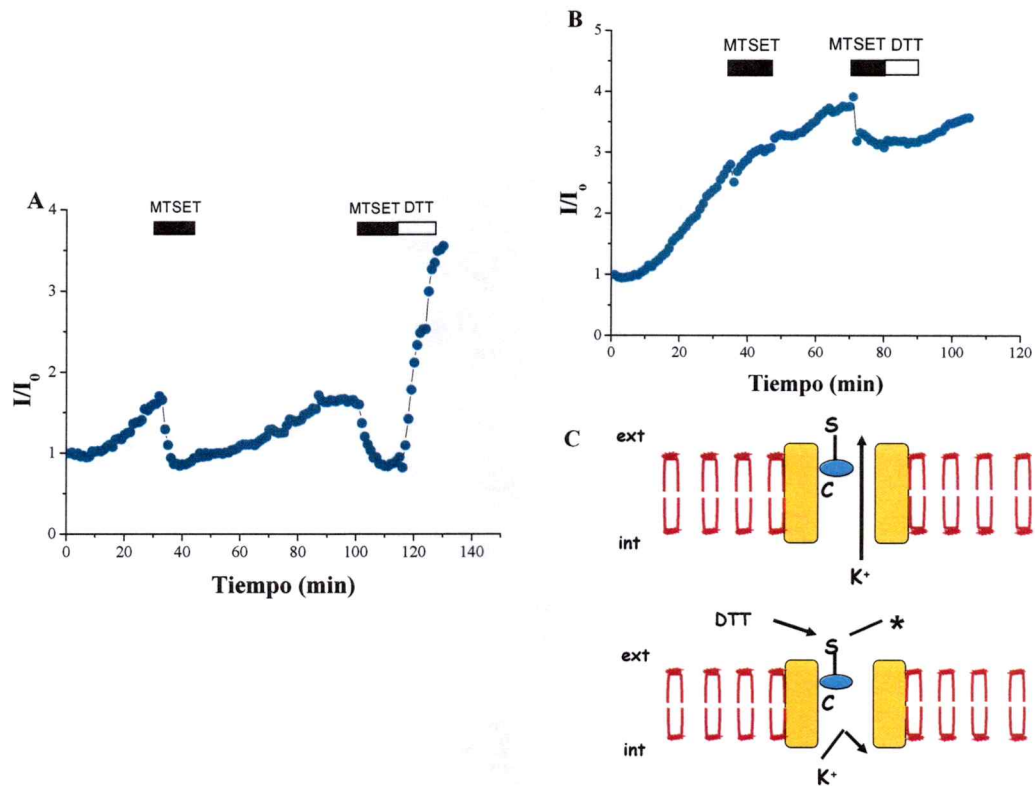


Figura 24. *El incremento de la corriente iónica se debe a la inserción de nuevos canales a la membrana plasmática.* A) Variación de la corriente normalizada en el tiempo de un ovocito inyectado con una relación 1:1 de las variedades mutante P450C y silvestre. Las barras negras muestran el tiempo que estuvieron los ovocitos expuestos a MTSET (10 μ M) y la barra blanca corresponde a la aplicación de DTT (1 mM). B) Comportamiento de un ovocito que solo presenta canales silvestres, para los cuales la aplicación de MTSET y DTT no tuvo efecto. C) Representación gráfica de la acción del MTSET sobre el canal mutante.

ANEXO III. *La inserción de canales en ovocitos previamente sometidos al protocolo de enfriamiento no es afectada ni por la Cicloheximida ni por la Brefeldina.*

La exposición prolongada a 4°C reduce la incorporación de nuevos canales de K⁺ a la membrana y de alguna manera, este reclutamiento se reanuda con el retorno de los ovocitos a temperatura ambiente. Muchos procesos, todos ellos probablemente muy dependientes de la temperatura, están involucrados; desde la traducción en los ribosomas hasta la expresión superficial. Para dilucidar que procesos podrían estar afectados se utilizaron dos drogas diferentes: cicloheximida (CHX, 25 mg/ml), un inhibidor de la síntesis peptídico, y Brefeldina A, un alcaloide que presumiblemente detiene el tráfico entre el RE y el aparato de Golgi, produciendo la acumulación de proteínas.

En primer lugar, se comparó el nivel de corriente entre ovocitos incubados con cicloheximida (CHX, 25 mg/ml), inmediatamente luego de ser inyectados y de 6 hs, y posteriormente incubados a 17°C, y ovocitos sometidos al protocolo PI17. La droga inhibe el transporte de las proteínas a la MP. Paralelamente, realizamos experimentos para determinar si el aumento de corriente post-protocolo PI4 es debido a la síntesis de nuevos canales de K⁺. Los ovocitos sometidos a cicloheximida

durante el tiempo que son incubados a 17°C muestran un incremento de su corriente comparable al observado en los ovocitos sometidos a PI4. Estos resultados *descartan la síntesis de nuevos canales iónicos como responsable del aumento de la expresión superficial.*

Como con cicloheximida, la incubación con 10 mM de Brefeldina A desde el momento de la inyección o luego de 6 hs de la misma y posterior incubación a 17°C, presentan niveles de corriente nula o menores, respectivamente, comparado con los ovocitos sometidos al protocolo PI17. Los registros post-protocolo PI4 en ovocitos incubados con la droga durante la incubación a 17°C también mostraron un aumento en la corriente. Así, brefeldina A parece no interferir con el incremento de la corriente. Con base estos resultados *podemos sugerir que el protocolo PI4, induce la acumulación de canales entre el Golgi y el TGN.*

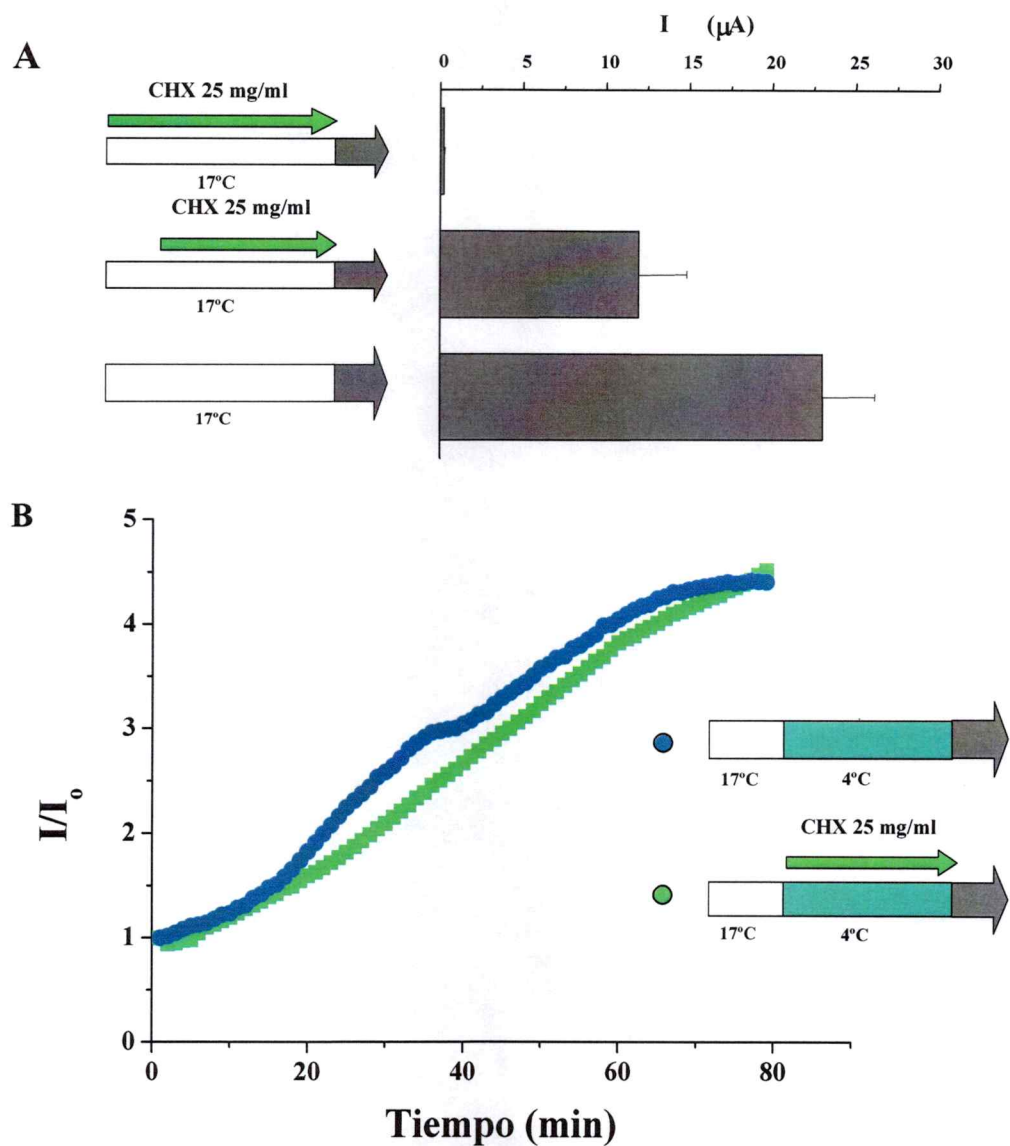


Figura 25. El aumento de la corriente es independiente de la síntesis proteica. A) Esquema de aplicación de la CHX y gráfico del efecto de la misma en la expresión de los canales, valores tomados al final del pulso de corriente a +40 mV (n=10). B) Curso temporal de la corriente normalizada en ovocitos tratados y no tratados con CHX (n=3). En el inserto se muestra el esquema de aplicación de la droga.

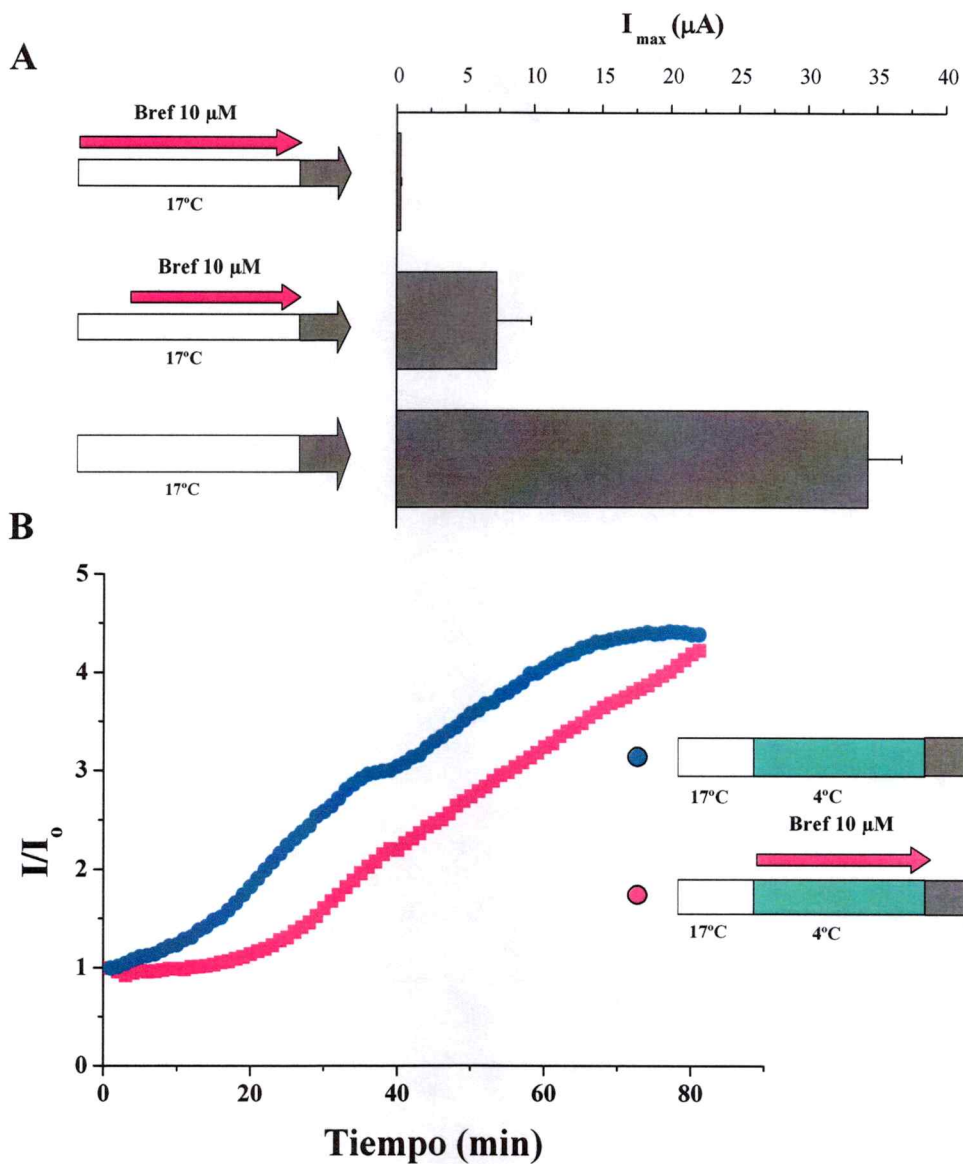


Figura 26. *El aumento de la corriente representa etapas tardías del proceso de inserción.* A) Esquema de aplicación de la Brefeldina A y gráfico del efecto de la misma en la expresión de los canales, valores tomados al final del pulso de corriente a +40 mV (n=10). B) Curso temporal de la corriente normalizada en ovocitos tratados y no tratados con Brefeldina A (n=3). En el inserto se muestra el esquema de aplicación de la droga.

ANEXO IV. Efecto del Ca^{2+} extracelular.

Desde hace muchos años está establecido que el Ca^{2+} participa en muchos procesos de exocitosis, figurando el más conocido la liberación de neurotransmisores (Katz y Miledi, 1967). Se realizaron registros de corrientes de K^+ , en ovocitos sometidos a PI4, en presencia de una solución Ringer que, en el inicio, contiene 1,8 mM $CaCl_2$ perfundida continuamente. A los 50 minutos de iniciado el registro, la perfusión se cambió 45 minutos a una solución similar pero sin Ca^{2+} agregado y conteniendo 1 mM de EGTA. *La reducción extracelular de Ca^{2+} durante este extenso período no produce un efecto aparente sobre la incorporación de canales a la MP.*

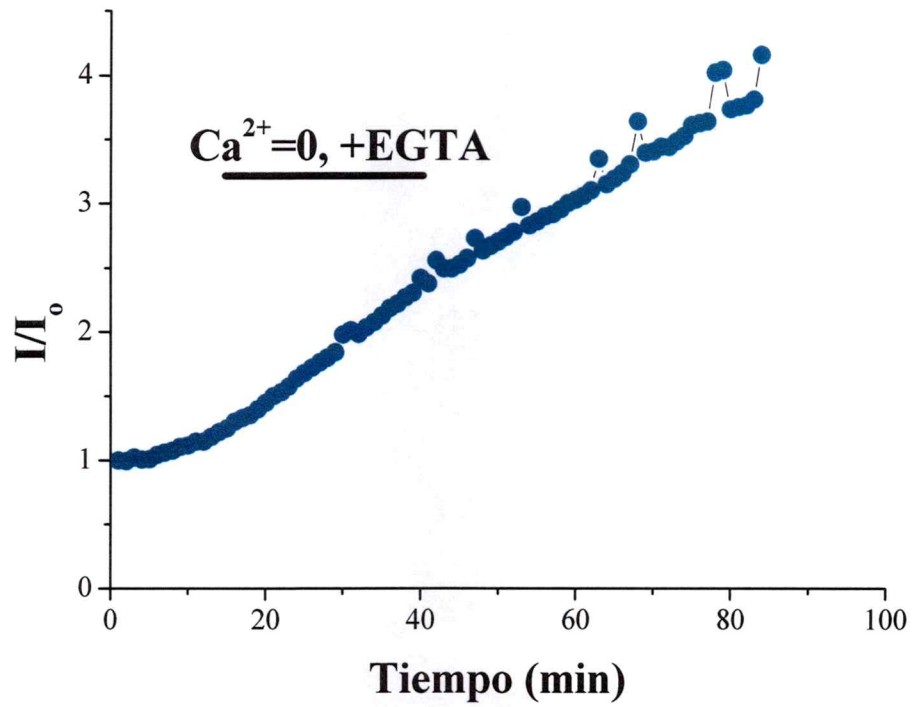


Figura 27. *La inserción de canales es independiente del Ca²⁺ extracelular* Se muestra un ejemplo donde se perfundió con solución Ringer sin Ca²⁺ agregado + EGTA 1mM durante el registro (n=3). La barra negra muestra el tiempo en que se perfundió con cero Ca²⁺.

ANEXO V. *La incorporación de canales Shaker a la MP depende de una señal intracelular de Ca²⁺.*

También se probó la participación del Ca²⁺ intracelular en este proceso. Así, perfundiendo externamente, huevos sometidos a PI4, con 1 mM EGTA, un quelante de divalentes, que teóricamente redujo la concentración de Ca²⁺ a 10⁻⁹ M, no produce efecto aparente sobre la cinética de incorporación de canales, pero fueron inhibidas por BAPTA-AM, indicando ser dependientes de Ca²⁺ intracelular. El BAPTA-AM es una forma permeable de BAPTA que puede penetrar a la célula a través de la MP y, una vez dentro, es hidrolizado por las esterasas, acumulándose intracelularmente. El paso siguiente fue comprobar si esta señal de Ca²⁺ intracelular era localizada. Para ello se comparó el efecto de otro tampón de Ca²⁺, EGTA-AM, con afinidad similar al BAPTA, pero con una velocidad de intercambio 10 veces más lenta. Estos experimentos muestran que el EGTA-AM es incapaz de producir una disminución en la tasa de aumento de la corriente, apoyando así la idea de que el Ca²⁺ involucrado en el proceso de inserción está espacial y temporalmente localizado.

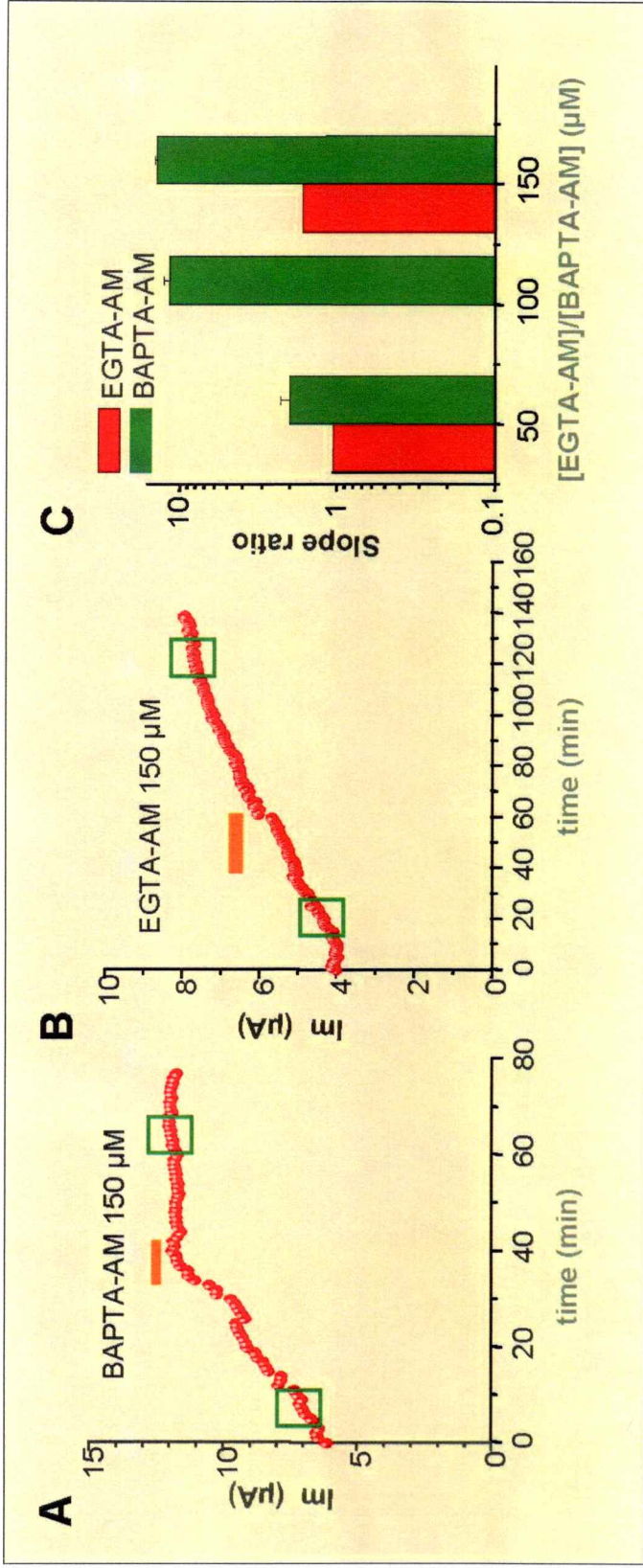


Figura 28. El Ca^{2+} intracelular que participa en la inserción es localizado. Los paneles A y B muestran ejemplos de los intervalos tomados para este análisis. Los valores de pendientes se tomaron en ventanas de tiempo de 10 minutos representados por los rectángulos verdes. En todos los casos estos valores se tomaron 20 minutos antes y 20 minutos después de la aplicación de los quelantes. C) Muestra la razón de las pendientes graficada contra la concentración de BAPTA y EGTA-AM ($n=4$)

ANEXO VI. Efecto Tapsigargina y Heparina.

Experimentos preliminares utilizando tratamientos con Tapsigargina, un inhibidor específico de la ATPasa que recaptura Ca^{2+} hacia el RE, e inyecciones de Heparina, un antagonista del receptor del inositol 1, 4,5 trifosfato (IP_3R), detuvieron la inserción de los canales en la MP. Inyecciones de CaCl_2 20 mM no revierten la disminución de corriente. A pesar de que la heparina es un inhibidor no específico (Bezprovanny y col, 1993), la inyección de 70 nl de 1 mg/ml de la droga, también produce una reducción del aumento de la corriente.

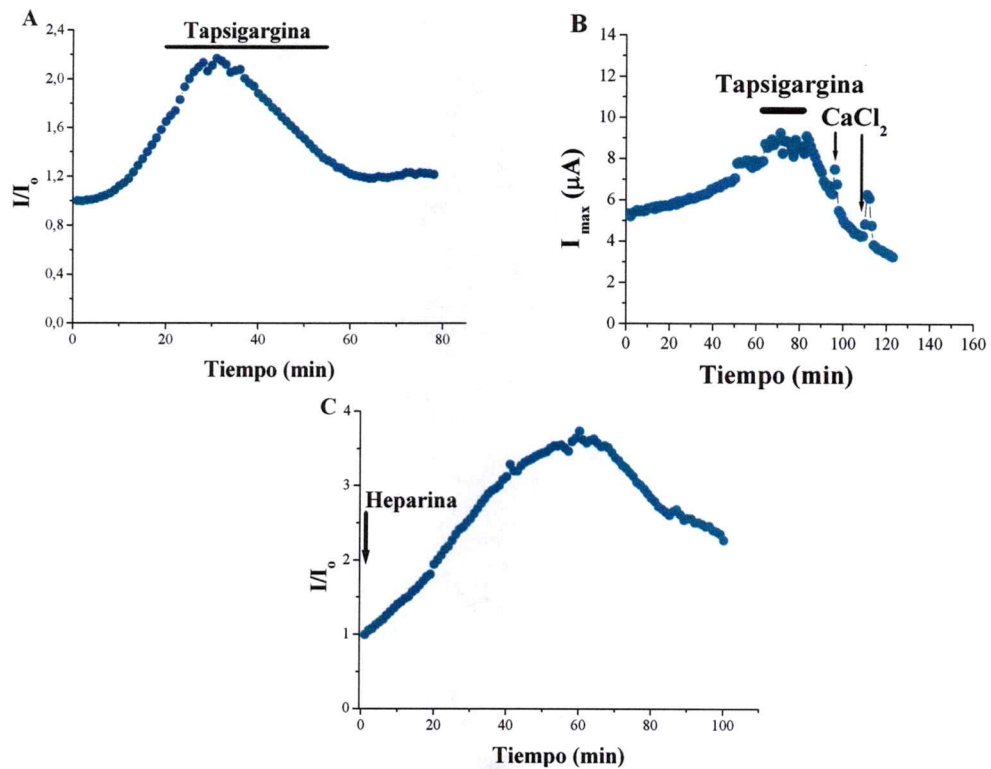


Figura 29. El Ca^{2+} involucrado proviene de almacenes intracelulares sensibles a IP_3 y Tapsigargina. Se muestran curvas de corriente normalizada vs tiempo en ovocitos: A) al que se le aplicó Tapsigargina 10 μM (n=3), B) al que se le intentó revertir el efecto de la Tapsigargina con inyecciones de Ca^{2+} ($CaCl_2$ 20 mM) (n=3) y C) al que se le inyectó Heparina 1mg/ml x 70 nl (n=3)