



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**“Análisis del efecto funcional de tres chaperonas sobre tres
mutantes del canal CNG relacionadas a retinopatías”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBT. KARINA DEL ROSARIO JUÁREZ NAVARRO

Diciembre de 2019
Victoria de Durango, Durango. México



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**“Análisis del efecto funcional de tres chaperonas sobre tres
mutantes del canal CNG relacionadas a retinopatías”**

Por:

IBT. KARINA DEL ROSARIO JUÁREZ NAVARRO

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

Presidente: DC. Angélica María López Rodríguez
Secretaria: DC. María Leticia Saucedo Mendiola
Vocal: DC. Estela Ruiz Baca

Diciembre de 2019
Victoria de Durango, Durango. México



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**“Análisis del efecto funcional de tres chaperonas sobre tres
mutantes del canal CNG relacionadas a retinopatías”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBT. KARINA DEL ROSARIO JUÁREZ NAVARRO

APROBADA POR LA DIRECTORA DE TESIS

DC. ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ

Diciembre de 2019
Victoria de Durango, Durango. México



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Análisis del efecto funcional de tres chaperonas sobre tres
mutantes del canal CNG relacionadas a retinopatías”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBT. KARINA DEL ROSARIO JUÁREZ NAVARRO

APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL

DC. ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ
PRESIDENTE

DC. MARÍA LETICIA SAUCEDO MENDIOLA
SECRETARIA

DC. ESTELA RUIZ BACA
VOCAL

Diciembre de 2019
Victoria de Durango, Durango. México.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a mis papás, Marcos Juárez y Petra Navarro, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Les agradezco por apoyarme en cada parte del camino, por creer en mí y ayudarme a cumplir mis sueños. Gracias por darme fortaleza en los momentos que más lo necesitaba.

De igual forma, agradezco a mis hermanos, Karen y Marcos, por brindarme su apoyo y su ayuda siempre.

Asimismo, quiero agradecer a todos mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología Molecular y Celular por proporcionarme su ayuda, motivación y consejos durante la realización del proyecto. Y en especial le agradezco a mi directora de tesis, la doctora Angélica López por darme la oportunidad de integrarme a su equipo y formar parte de uno de sus proyectos. Le estoy muy agradecida por todas las enseñanzas y consejos que me dio. Sin su motivación, apoyo y aliento no habría podido lograrlo. Gracias por su compañía y amistad, y por enseñarme que todo es posible.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Molecular y Celular de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Este proyecto fue posible gracias al apoyo económico de CONACYT-UJED-CONACYT-CB-2015-259091, de la beca CONACYT con número (CVU/Becario): 857765/637362 de KRJN y la beca SEP-CONCYT 29363 de KRJN.



DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi amiga y mentora la doctora Angélica López, quien me apoyó incondicionalmente durante mi maestría; Y a mis papás, quienes me han motivado siempre a seguir mis sueños.

ABREVIATURAS

8-Br-GMPc	8-Bromo guanosin monofosfato cíclico
A	Armstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
ADP	Adenosin trifosfato
Ag/AgCl	Plata/cloruro de plata
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcio
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CNBD	Cyclic Nucleotide Binding Domain
CNG	Cyclic Nucleotide Gated
CNGA1	Subunidad α 1 del canal CNG bovino
CO ₂	Bioxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ERAD	Degradación asociada a RE
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
ERAF	Facilitación asociada al plegamiento proteico en RE
ERQC	Control de calidad de RE (ER quality control)
FBS	Suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
gr	Gramos
Gt	G transducina
G Ω	Giga ohm
h	Horas
Hsp	Proteína de choque térmico (Heat shock proteins)
KCl	Cloruro de plata
KDa	Kilo Daltones
kHz	Kilo Hertz
min	Minutos
mM	Millimolar
mV	Milivolts
Na ⁺	Sodio
NEF	Factores de intercambio de nucleótidos
nm	Nanómetros
PBA	Fenilbutirato de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesteras

RE	Retículo Endoplásmico
RGS9	Proteína G de Señalización 9
Rh	Rodopsina
Rh*~P	Rh* fosforilada
rpm	Revoluciones por minuto
TM	Transmembrana
TMAO	Óxido de trimetilamina
U/ml	Unidades por mililitro
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response)
Δ F508	Deleción de la fenilalanina 508
μ l	Microlitros

RESUMEN

Algunas mutaciones en la secuencia codificante para proteínas de membrana plasmática tienen diversas consecuencias fisiológicas, por ejemplo, muchas mutaciones en los genes que codifican los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) reflejan su defecto estructural induciendo retención intracelular y/o disfunción; afectando como consecuencia los procesos de fototransducción en los que regularmente están implicados, al facilitar el transporte de cationes como calcio y sodio. De manera que la disfunción de los canales CNG se asocia patológicamente a un espectro de trastornos retinianos hereditarios mejor conocido como retinitis pigmentosa. Dado que la retención intracelular de proteínas afecta la función de las proteínas que al no alcanzar su destino final no cumplen con su papel fisiológico, en este trabajo con la finalidad de establecer estrategias terapéuticas que permitan el rescate de proteínas asociadas a proteínas mal plegadas y con defectos de tráfico, se probó el efecto de las chaperonas Hsp70 y glicerol sobre tres canales mutados de CNG fusionados a la proteína verde fluorescente (CNG_{S316F}-GFP, CNG_{I384T}-GFP y CNG_{R424H}-GFP), expresados en células HEK-293; además de inducir la sobre-expresión natural de chaperonas incubando los cultivos celulares a 27°C. Después de analizar mediante microscopía de fluorescencia se determinó que, aunque una fracción de los canales mutantes se expresa en membrana, estos presentan mayor retención intracelular en comparación al canal silvestre y al examinar su funcionalidad mediante la técnica de patch clamp no se observó corriente. El efecto de los tratamientos aplicados sobre las células no favoreció su expresión en membrana plasmática.

ABSTRACT

Diseases caused by defects in folding or trafficking of cell-surface ion channels demonstrate how genetic mutations lead to problems with physiological consequences, for example, many mutations in the genes encoding cyclic nucleotide gated (CNG) ion channels, an essential phototransduction protein allowing cations transport, reflects the impaired trafficking or dysfunctionality as a spectrum of inherited retinal disorders called retinitis pigmentosa. As an approach to rescue location and functionality of phenotypic diseases, here we tested the effect of chaperone molecules such as Hsp70 and glycerol on three CNG mutated channels tagged to green fluorescent protein (CNG_{S316F}-GFP, CNG_{I384T}-GFP y CNG_{R424H}-GFP) expressed on HEK-293 cells; further analyzing if inducing the over-expression of chaperones will influence impaired channels location by decreasing temperature from 37 to 27°C. Our results shown that even when a fraction of mutant channels is located at plasma membrane, there is a higher intracellular protein retention compared to the wild channels with no current while tested by patch clamp technique. The applied treatments did not favor their expression in plasma membrane.

Índice de contenido

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria	iii
Abreviaturas	iv
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de contenido	
Índice de figuras	
Índice de tablas.....	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Retinitis pigmentosa.....	3
1.2 Canales CNG.....	4
1.2.1 Estructura del canal CNG	5
1.2.2 Función del canal CNG.....	6
II. ANTECEDENTES.....	9
2.1 Mutaciones en la subunidad A1 del canal CNG	9
2.2 Las chaperonas	11
2.2.1 Chaperonas moleculares	11
2.2.2 Chaperonas químicas.....	13
2.2.3 Otras formas de afectar el plegamiento proteico.....	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. HIPÓTESIS.....	17
V. OBJETIVO GENERAL	17
5.1. Objetivos específicos.....	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. El vector de expresión.	19
6.2. Inducción de las mutaciones S316F, I384T y R424H sobre el canal CNG-GFP.....	19
6.2.1. PCR mutagénica	20
6.3. Transformación de bacterias TOP10 gold.	21
6.4. Extracción de ADN plasmídico	22
6.4.1 Miniprep	22
6.4.2 Midiprep	22
6.5. Secuenciación.	24
6.6. Transfección de células HEK-293 con el vector pACNNGGFP-N2 silvestre o mutagénico.	24
6.7. Determinación de la localización de las proteínas CNG en células HEK-293.....	25
6.8. Inducción del efecto de rescate mediante la exposición a chaperonas.....	25
6.9. Electrofisiología.....	26

6.10. Análisis de datos.....	27
VII. RESULTADOS	28
VIII. DISCUSIÓN.....	37
IX. CONCLUSIONES.....	41
XI. BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	48

Índice de figuras

Figura 1. Canal CNG	4
Figura 2. Estructura del canal CNG	6
Figura 3. Fototransducción en los vertebrados	6
Figura 4. Expresión del canal CNG silvestre CNG _{S316F} en células HEK-293.....	10
Figura 5. Localización de los canales CNG mutantes y silvestre en células HEK-293.....	15
Figura 6. Estrategia general	17
Figura 7. Características de vector pAcCNGGFP1-N2 con el canal CNG fusionado a GFP.....	18
Figura 8. Vector pCherry_Hsp70	25
Figura 9. Protocolo para analizar la función de los canales CNG	26
Figura 10. Productos de ADNp de las tres mutantes: S316F, I384T y R424H	29
Figura 11. Electroferograma de la inducción de la mutación S316F	27
Figura 12. Electroferograma de la inducción de la mutación I384T.....	28
Figura 13. Electroferograma de la inducción de la mutación R424H	28
Figura 14. Localización y función de los canales CNG _{I384T} , CNG _{S316F} y CNG _{R424H}	29
Figura 15. Efecto de la temperatura (27°C) sobre la localización de los canales CNG	30
Figura 16. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG silvestre.....	31
Figura 17. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG _{S316F}	31
Figura 18. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG _{I384T}	32
Figura 19. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG _{R424H}	33
Figura 20. Vector pEGFP_Hsp70	34
Figura 21. Sobre-expresión de la chaperona Hsp70 en cultivos de células HEK-293	34
Figura 22. Co-expresión de los canales CNG (mutantes y silvestre) y la chaperona Hsp70.....	35

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos mutagénicos	19
Tabla 2. Componentes de la reacción para PCR	19
Tabla 3. Parámetros de PCR mutagénica	19

I. INTRODUCCIÓN

Todas las proteínas tienen una estructura tridimensional particular, que está determinada por el orden de los aminoácidos de la cadena polipeptídica, la cual es sintetizada en los ribosomas (Buchner y Kiefhaber, 2008). Una vez que la cadena nascente emerge del ribosoma, tiene que ser sintetizada de forma completa para que pueda adoptar su conformación nativa. Esto representa un riesgo, ya que una cadena polipeptídica incompleta que contiene grupos hidrofóbicos expuestos puede formar agregados, induciendo patologías que incluyen enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, diabetes tipo II, diversos tipos de cánceres e incluso retinopatías como la Retinitis pigmentosa (Douglas y Dillin, 2010; Hipp y cols., 2014; Labbadia y Morimoto, 2015). Para evitar las anomalías conformacionales en la síntesis proteica, las células han desarrollado sistemas complejos de control de calidad que involucran componentes entre los que se incluyen las moléculas chaperonas y otras enzimas que facilitan el plegamiento proteico (Vabulas y cols., 2010).

Sin embargo, aún después de varias décadas de investigación los mecanismos de plegamiento y ensamblaje son poco entendidos para las proteínas transmembranales (Booth y cols., 2001; Fiedler y cols., 2010), una clase de proteínas embebidas en membranas celulares (Cournia y cols., 2015), cuya conformación es mediada por su interacción con los lípidos que la rodean.

Las implicaciones biológicas de la interacción de las proteínas con las membranas biológicas apenas comienzan a ser exploradas, diversos estudios han evidenciado que ciertos receptores se agrupan y oligomerizan en las membranas lipídicas (Stone y cols., 2017) y esta interacción podría modificarse dependiendo de la constitución lipídica de las membranas, de manera que una asociación inapropiada lípido-membrana podría tener consecuencias patológicas (Bogdanov y cols., 2008).

Las proteínas transmembranales empiezan a plegarse para adquirir su conformación de manera co-transduccional, el plegamiento empieza en los ribosomas (Dobson, 2004) y continua cuando la proteína es translocada en la membrana del retículo endoplásmico a través del translocon; de manera que el proceso de síntesis y plegamiento proteico está principalmente supervisado por el sistema de control de calidad del retículo endoplásmico (RE) mejor conocido como ERQC (ER quality control) (Araki y Nagata, 2011; Vembar y Brodsky, 2008; Vincenz-Donnelly y Hipp, 2017). Además del translocon, el sistema ERQC se puede dividir en tres subsistemas: 1) El grupo de proteínas implicadas en la facilitación asociada al plegamiento proteico en RE (ERAF), 2) las proteínas involucradas en el reconocimiento y la exportación de proteínas correctamente plegadas y 3) el conjunto de proteínas conocidas como ERAD (ER degradación asociada) involucradas en el reconocimiento y direccionamiento (hacia la vía de re-plegamiento o degradación) de las proteínas mal plegadas (Chiang y cols., 2015; Ellgaar y cols., 1999; Vembar y Brodsky, 2008).

Uno de los componentes de la ERQC es la proteína de choque térmico Hsp70 un miembro de la familia de proteínas de unión a inmunoglobulina (BiP) (Gething, 1999; Pincus y cols., 2010; Pobre y cols., 2018). Hsp70 se encuentra en el lumen del ER (aunque también hay reportes de su expresión citosólica), desde donde reconoce proteínas mal plegadas y funciona como chaperona favoreciendo y estabilizando el plegamiento proteico. Los miembros de la familia BiP incluyen un dominio de unión a ATP y un dominio de unión al sustrato (Yang y cols., 2015), el dominio de unión a sustrato contiene una cavidad hidrofóbica que reconoce residuos hidrofóbicos expuestos, regularmente las proteínas BiP unidas a ATP se encuentran en un estado abierto, pero tras la unión del sustrato (también llamado cliente), se hidroliza el ATP induciendo una mayor afinidad por el sustrato, luego algunos factores de intercambio de nucleótidos (NEF) como Sil1 y Drp170 catalizan el intercambio de ADP por ATP y favorecen la disociación de la proteína del cliente (Sousa y Lafer, 2006). BiP también se asocia con una variedad de co-chaperonas como las de la familia DNAJ/Hsp40 (ERdj1-7) que son proteínas que

facilitan el plegamiento oxidativo, el reordenamiento de enlaces disulfuro y la reducción de enlaces disulfuro (Qiu y cols., 2006).

Dado que las proteínas de membrana constituyen un tercio de todas las proteínas encontradas en la célula (Whitelegge, 2013) representan aproximadamente el 60% de los blancos farmacológicos actuales (Yin y Flynn, 2016) ya que llevan a cabo una gran cantidad de funciones vitales, entre las que se incluye la homeostasis iónica y la transducción de señales, entre otras (Cournia y cols., 2015). El correcto plegamiento proteico es fundamental para la actividad celular normal, cualquier falla en el proceso puede tener consecuencias desfavorables que se manifiestan como patologías (Oxenoid y cols., 2001). Incluso mutaciones puntuales en la secuencia aminoacídica pueden ocasionar un plegamiento erróneo y causar desordenes genéticos severos (Forloni y cols., 2002), como en el caso de patologías visuales conocidas como retinopatías, particularmente la retinitis pigmentosa, un conjunto de enfermedades caracterizadas por la pérdida progresiva de la visión (Goldstein, 2013).

1.1 Retinitis pigmentosa

Las retinopatías son enfermedades no inflamatorias que dañan a la retina y se caracterizan por la pérdida de la visión central o periférica. La retinitis pigmentosa engloba un grupo de enfermedades que involucran una degeneración progresiva de la retina, usualmente empiezan en la periferia media y avanzan hacia la macula y fovea. Los síntomas típicos incluyen ceguera nocturna seguida de una disminución en el campo visual, que conduce a ceguera legal o, en muchos casos a ceguera completa (Hartong y cols., 2006). A nivel celular, el sistema de las células fotorreceptoras llamadas conos y bastones, se ve afectado. En estadios avanzados los conos se muestran dañados y eventualmente causan ceguera completa. Los fotorreceptores afectados sufren apoptosis (Marigo, 2007), que se refleja en una disminución del espesor de la capa nuclear externa dentro de la retina, así como en lesiones y/o depósitos de pigmento retiniano (cúmulos proteicos). Los pacientes pueden perder una porción significativa de los fotorreceptores antes de presentar pérdida de la agudeza visual.

La retinitis pigmentosa tiene una prevalencia mundial de 1: 3000 a 1: 7000 personas y no muestra una especificidad étnica, sin embargo, los estudios de genotipificación muestran que es causada principalmente por mutaciones que afectan las secuencias codificantes del canal iónico dependiente de nucleótidos cíclicos mejor conocido como canal CNG (por sus siglas en inglés: Cyclic Nucleotide Gated) (Ferrari y cols., 2011).

1.2 Canales CNG

Los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (canales CNG), son canales que se activan por la unión de GMPc (Guanosín monofosfato cíclico) o AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) y juegan un papel crucial en la visión de los vertebrados, participando en la fototransducción. Estos canales se abren y se cierran en respuesta a los cambios inducidos por la luz en la concentración intracelular de GMPc; los cambios resultantes en el potencial de membrana debido al flujo de Ca^{2+} modulan la actividad en el terminal sináptico del fotorreceptor (Duricka y cols., 2012).

Los canales CNG forman complejos heterotetraméricos que consisten en dos o tres diferentes tipos de subunidades. Hay seis genes que los codifican, cuatro subunidades A (A1 a A4) y dos subunidades B (B1 y B3), que dan lugar a tres canales diferentes en los conos y los bastones. Estos canales iónicos permiten el paso de cationes al interactuar con su ligando (los nucleótidos cíclicos) (Figura 1).



Figura 1. Canal CNG. Los canales CNG forman complejos de cuatro subunidades.

Diversos estudios han demostrado que los canales CNG presentes en los bastones están formados por tres subunidades CNGA1 y una subunidad CNGB1, mientras que los canales CNG de los conos están formados por dos subunidades CNGA3 y dos subunidades CNGB3. Sólo las subunidades CNGA1 y CNGA3 forman canales homoméricos funcionales (Matulef y Zagotta, 2003).

A la fecha más de cien mutaciones han sido evidenciadas en estas proteínas, demostrando la importancia fisiológica de los canales CNG en la visión, principalmente en RP y acromatopsia, un trastorno visual donde los pacientes no pueden apreciar todas las gamas de colores, las mutaciones que causan estos defectos se encuentran en las subunidades CNGA1 y CNGA3, respectivamente (Genead y cols., 2011).

Los canales CNG también se encuentran en las neuronas olfativas donde participan en un complejo proceso para traducir señales olfativas y están además, presentes en tejidos no sensoriales como el hipocampo, corazón, testículos, riñón, páncreas, glándula suprarrenal y colon; sin embargo la función que realizan en estos tejidos no es muy clara (Matulef y Zagotta, 2003).

1.2.1 Estructura del canal CNG

Todas las subunidades del canal CNG comparten la misma estructura básica. Los canales CNG se componen de cuatro subunidades que se encuentran alrededor de un poro localizado en el centro. Cada subunidad contiene seis segmentos transmembranales (S1 a S6), una región de sensor de voltaje (S4), un lazo reentrante en la membrana entre S5 y S6 que se denomina lazo p por ser parte integral de la región del poro, además de las regiones intracelulares amino-terminales y carboxi-terminales (Matulef y Zagotta, 2003). Entre las regiones importantes para permitir el paso de iones se destaca el dominio intracelular de unión a nucleótidos cíclicos y el lazo P que incluye los aminoácidos que determinan la selectividad iónica (filtro de selectividad) (Figura 2) (Wang y cols., 2007).

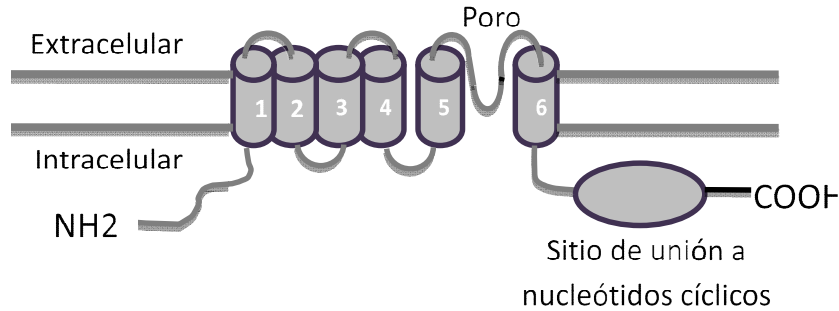


Figura 2. Estructura del canal CNG. Cada subunidad del canal CNG está formada por seis pases transmembranales y un dominio intracelular de unión a nucleótidos cíclicos.

1.2.2 Función del canal CNG

La fototransducción se lleva a cabo en el segmento externo (OS: other segment) de los fotorreceptores, que está fuertemente empaquetado con discos de membrana llenos del pigmento visual, rodopsina (Rh). Los componentes clave de la fototransducción son la rodopsina activada (Rh*), proteína G transducina (Gt), fosfodiesterasa (PDE) y el GMPc (Figura 3) (Yau y Hardie, 2010).

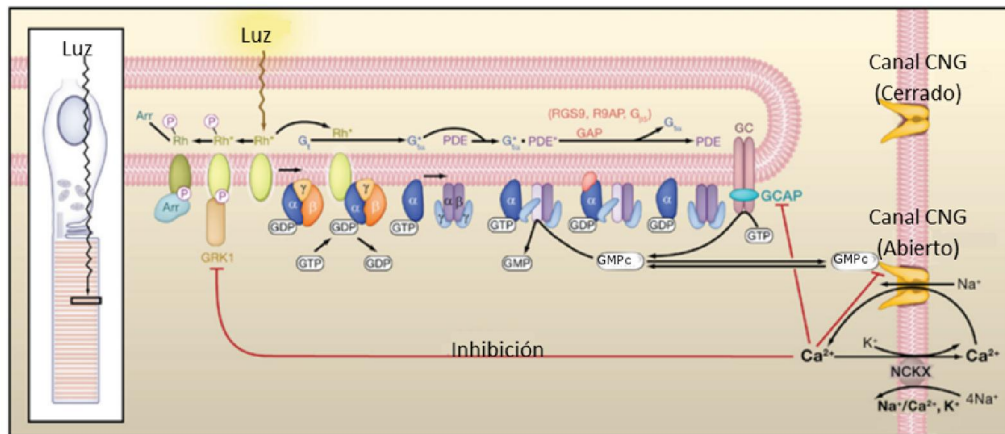


Figura 3. Fototransducción en los vertebrados. La luz estimula a la rodopsina (Rh*), quien activa a la proteína Gt. La subunidad Gt α activa a la PDE, que hidroliza a GMPc en GMP, causando que los canales CNG abiertos en condiciones de oscuridad se cierren.

En la membrana de los fotorreceptores una vez que la a Rh* activa a la Gt, como consecuencia se cataliza guanosil difosfato (GDP) a guanosil trifosfato (GTP) en el sitio de unión a guanina de la subunidad α de Gt (Gt α), que se une a GDP. La Gt α activa (Gt α^*) se disocia de las subunidades de transducina $\beta\gamma$ y se une a la PDE γ . Este enlace elimina la inhibición por la fosfodiesterasa (PDE) y sobre las subunidades catalíticas de PDE $\alpha\beta$, permitiendo que estas últimas hidrolicen

GMPc. En cada complejo de PDE hay un PDE α y un PDE β que están fuertemente asociados entre sí, además de dos subunidades PDE γ . Así, un Gt α^* estimula sólo la mitad de la actividad del tetrámero PDE. Una vez que el Gt α se une al GTP, se disocia la Rh* de Gt y continúa encontrando y activando otros Gt's. Inicialmente se pensó que un Rh* activa hasta 103 Gt's durante la respuesta de un solo fotón, que dura ~1 s a temperatura ambiente. Sin embargo, ahora se piensa que sólo ~20 moléculas de Gt α^* son producidas por un Rh* durante la respuesta de un solo fotón en los bastones de un ratón. Esta es una amplificación sustancial en la señalización. Además, la alta velocidad hidrolítica de la PDE activa (PDE*) proporciona una amplificación adicional (Yau y Hardie, 2010).

La desactivación de la fototransducción es compleja. Para lograr una desactivación completa, cada componente activo debe apagarse y la Rh*, que corresponde al estado meta-II de Rh, decae durante un minuto en un estado inactivo (meta-III). Sin embargo, mucho antes de esta desintegración, Rh* es fosforilada por una rodopsinasa quinasa (ahora llamada proteína-acoplada a proteína G-quinasa 1, o GRK1), enseguida rápidamente se une otra proteína, arrestina (Arr), que reconoce la Rh* fosforilada (Rh*~P). Rh*~P todavía tiene alguna actividad, pero Rh*~P-Arr pierde toda actividad. Existen 6-7 sitios de fosforilación C-terminal (residuos de serina/treonina) en Rh, de los cuales la mayoría o todos aparentemente necesitan ser fosforilados para la desintegración normal de la respuesta; de lo contrario, la disminución de la respuesta se ralentiza. Eventualmente, Rh, en el estado libre de opsina después de la desintegración o hidrólisis de meta-III o en el estado de rodopsina regenerado, pierde su arrestina unida y es desfosforilada, muy probablemente por la acción de una fosfatasa genérica, tal como la proteína fosfatasa 2A (Yau y Hardie, 2010).

Gt α^* se desactiva por la actividad de GTPasa, que convierte el Gt α^* GTP activo en Gt α GDP inactivo. Esta actividad de la GTPasa, como en algunas otras subunidades G α , es facilitada por un complejo de proteína activadora de GTPasa (GAP). En los conos, este complejo consiste en una proteína llamada Regulador de la proteína G de Señalización 9 (RGS9), una proteína de anclaje (R9AP) y una

proteína G disociada de subunidad β ($G\beta_5$), juntos con el sustrato de $G\alpha^*$, $PDE\gamma$. El requerimiento de $PDE\gamma$ asegura que $G\alpha^*GTP$ ha encontrado y activado su sustrato antes de que se produzca la desactivación. Tras la hidrólisis de GTP, el $G\alpha GDP$ resultante se disocia de $PDE\gamma$ y se asocia con $G\beta\gamma$, permitiendo que $PDE\gamma$ reanude su inhibición de $PDE\alpha\beta$. Se piensa que $PDE\gamma$ nunca se disocia físicamente de $PDE\alpha\beta$ durante la activación de PDE, sino que simplemente está desplazado estéricamente. Debido a que la estequiometría de PDE es $1PDE\alpha\beta:2PDE\gamma$, ambos constituyentes $PDE\gamma$ tienen que ser restaurados antes de que la enzima decline completamente a su estado oscuro. Existe cierta actividad oscura de PDE, que equilibra la actividad constituyente de guanilato ciclasa (GC) para mantener una concentración de $GMPc$ libre estable de $\sim 1 \mu M$. Por último, aunque el $GMPc$ libre citoplasmático es $\sim 1 \mu M$, la concentración total de $GMPc$ en el segmento externo del cono es mucho mayor, a $\sim 60 \mu M$, casi todo el cual está estrechamente unido a sitios no catalíticos en PDE ($\sim 30 \mu M$ tetrámeros de PDE, sitio único de unión no catalítico en cada uno de PDE α y PDE β). El $GMPc$ enlazado no intercambia fácilmente con el $GMPc$ libre y se libera sólo cuando el $GMPc$ libre disminuye hasta un nivel muy bajo en luz brillante, supuestamente para modular la actividad catalítica de $PDE\alpha\beta$ (Yau y Hardie, 2010).

En la oscuridad el $GMPc$ libre está a una concentración relativamente alta y por unión directa, mantiene a los canales CNG de la membrana plasmática en el estado abierto. Los canales CNG no muestran ninguna desensibilización al ligando, en la oscuridad estas proteínas mantienen un flujo constante de cationes como sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) hacia el interior de la célula (“corriente oscura”) y despolarizan suficientemente a la célula (potencial de membrana oscuro) a $-30 mV$ para mantener la liberación del transmisor sináptico. La disminución graduada inducida por la luz en $GMPc$ libres cierra los canales CNG, hiperpolarizando la célula y reduciendo o deteniendo la liberación del transmisor sináptico. En los bastones, la rodopsina, proteína G y fosfodiesterasa tienen concentraciones relativas de aproximadamente 100:10:1.

II. ANTECEDENTES

2.1 Mutaciones en la subunidad A1 del canal CNG

En el genoma humano seis diferentes genes codifican las subunidades conformando los canales CNG: 4 subunidades alfa (A1 a A4) y dos subunidades beta (B1 y B3). Más de 100 mutaciones en las subunidades codificantes del canal CNG han sido identificadas distribuidas indiscriminadamente en la topología del canal, reflejando así la importancia estructural en su funcionalidad.

De manera particular, en la subunidad A1 del canal CNG, se han identificado 8 mutaciones: dos de ellas generan la eliminación del marco abierto de lectura (R654fsX (Dryja y cols., 1995) y S209fsX26 (Zhang y cols., 2004)), tres son mutaciones sinsentido (R28X (Paloma, 2002), E76X (Dryja y cols., 1995), K139X (Dryja y cols., 1995)) y tres son mutaciones que inducen un cambio aminoacídico: S316F (Dryja y cols., 1995), I384T (González-del Pozo y cols., 2011) y R424H (Jin y cols., 2008).

Dryja (1995) y colaboradores expresaron la mutación S316F en células embrionarias de riñón humano (HEK-293), reportando que la proteína mutante se localiza mayormente retenida intracelularmente y al analizar la funcionalidad mediante la técnica electrofisiológica de patch clamp observaron que la mayoría de los canales que llegaron a la membrana plasmática no eran funcionales ya que, de los 85 parches realizados, únicamente en 3 detectaron corriente (Dryja y cols., 1995) (Figura 4).

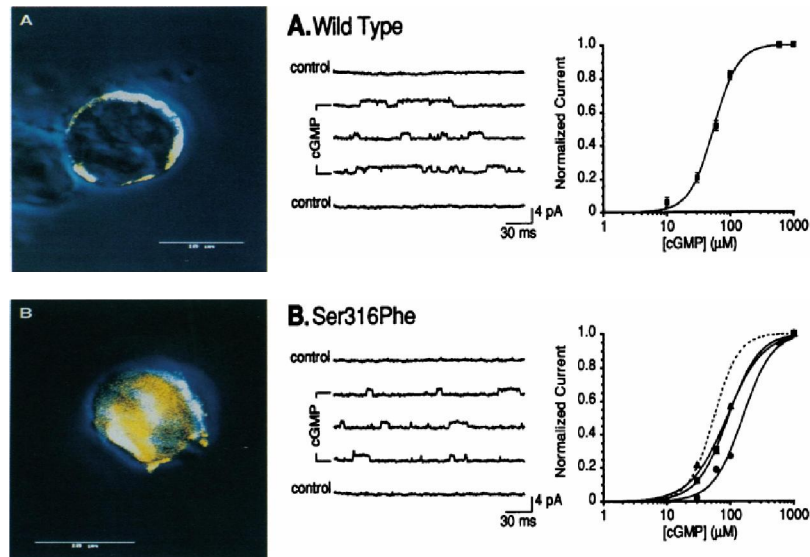


Figura 4. Expresión del canal CNG silvestre y CNG_{S316F} en células HEK-293. **A.** Canal CNG silvestre. **B.** Canal CNG_{S316F}. En la primera columna se muestran imágenes confocales de la inmuno-marcación del canal CNG; los colores amarillo y blanco indican la ubicación de la proteína. En la segunda columna se presentan los resultados electrofisiológicos en ausencia y presencia de cGMP en ambos casos. La concentración de cGMP fue de 10 μM . El potencial de membrana se mantuvo a +60 mV. La tercera columna muestra la relación dosis-respuesta entre la corriente media normalizada y la concentración de cGMP. Los valores de $K_{1/2}$ y n , respectivamente, son 55 μM y 2.3 en A; 93 μM y 1.8 (■), 88 μM y 1.5 (▲), y 157 μM y 1.9 (●).

Entender los factores que determinan la estructura y la dinámica de las proteínas de membrana, durante el plegamiento correcto y aberrante, es de gran relevancia para la identificación de alternativas para tratar enfermedades relacionadas. El uso de sustancias o moléculas que aseguran el tráfico y la función adecuada de proteínas, previniendo la degradación o formación de agregados es fisiológicamente importante durante la síntesis y ensamblado proteico. De manera natural la célula cuenta con un sistema de moléculas y proteínas que favorecen el plegamiento proteico correcto en determinadas condiciones fisiológicas, por ejemplo las proteínas que se activan en condiciones calor extremo se les llama chaperonas y así como estas existen también moléculas lipídicas que controlan el plegamiento proteico, asegurando el estado conformacional energéticamente más favorable para el mantenimiento y la proliferación celular (Ellis y Hemmingsen, 1989; Frydman y cols., 1994).

2.2 Las chaperonas

Las chaperonas son reguladores celulares expresados en diferentes regiones o en un tejido específico y son cruciales para el plegamiento de un amplio número de proteínas llamadas clientes (Craig y cols., 1993; Li y Srivastava, 2004). Estos reguladores no aportan información adicional para que las proteínas adquieran su estructura tridimensional, sino que, la estructura está determinada únicamente por la secuencia aminoacídica y las chaperonas solo participan en el proceso de ensamblaje (Mas y Hiller, 2018). Aunque muchas mutaciones en genes codificando proteínas transmembranales como los canales iónicos pudieran no intervenir con la función de la proteína afectada, pueden inducir enfermedades al afectar el tráfico celular de la proteína, evitando que llegue a su destino celular donde deberían cumplir con su función. Debido a la abundancia de enfermedades inducidas por defectos del plegamiento o tráfico proteico se han propuesto diversas estrategias para rescatar el daño conformacional (Hartl y cols., 2011). Una estrategia reciente usada para prevenir el mal plegamiento proteico y revertir la retención intracelular es modificar el ambiente donde ocurre el plegamiento en la célula al afectar la termodinámica de proteínas usando chaperonas moleculares, farmacológicas o químicas (Arakawa y cols., 2006; Morello y cols., 2000).

2.2.1 Chaperonas moleculares

Las chaperonas moleculares son una familia de proteínas que pueden reconocer inconsistencias en las conformaciones proteicas. La mayoría de estas chaperonas fueron descubiertas como proteínas expresadas en respuesta a cambios en la temperatura o estrés ambiental y fueron nombradas como proteínas de choque térmico (Heat shock protein (Hsp)) (Akerfelt y cols., 2012).

Existen 20 familias diferentes de proteínas con actividad chaperona, clasificadas de acuerdo a su peso molecular. Las principales familias son Hsp90, Hsp40 (DnaJ), Hsp70, Hsp60 (chaperoninas) y proteínas de choque térmico pequeñas (sHsps) (Brehme y cols., 2014; Kaiser y cols., 2006). Una de las familias más estudiadas y mayormente implicada en la conformación de proteínas de membrana plasmática es Hsp70.

Se ha demostrado que Hsp70 tiene un papel protector previniendo la formación de agregados proteicos y además ha rescatado a diversas mutaciones. Un ejemplo clásico de la actividad de chaperonas en el plegamiento de canales iónicos se da en el canal de cloro CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), cuya disfunción es causante de fibrosis quística. CFTR incluye en su estructura dominios expuestos a la parte citosólica que tiene carácter acuoso y el plegamiento de estos dominios está mediado por proteínas chaperonas como chaperonas del tipo Hsp70 y Hsp90 y proteínas accesorias que interactúan de manera soluble (Young, 2014). De manera que el plegamiento del canal CFTR está mediando la acción coordinada de chaperonas residentes en RE y chaperonas citosólicas, además de otras moléculas con actividad de chaperona. En 2001 Lee y colaboradores reportaron que la sobre-expresión de la chaperona Hsp70 en cultivos celulares IB3-1 expresando canal mutante $\Delta F508$, causante de aproximadamente el 70% de los casos de fibrosis quística; disminuye la retención intracelular causada por esta mutación, favoreciendo su expresión en membrana plasmática (Choo-Kang y Zeitlin, 2001).

Por otra parte, en la biosíntesis del canal iónico hERG importante para la funcionalidad y mantenimiento del ritmo cardíaco, también se ha evidenciado que el equilibrio entre la exportación ER y la retención proteica esta mediada recíprocamente por la chaperona Hsp70 citosólicas y su homólogo citosólico Hsc70, promoviendo el plegamiento y la degradación proteica (Young, 2014), además de que estudios in vitro muestran que la co-expresión de Hsp70 con hERG aumenta la expresión de proteica y disminuye su ubiquitinación, mientras la co-expresión de opuesto Hsc70 induce el efecto opuesto.

2.2.2 Chaperonas químicas

Algunas moléculas orgánicas pequeñas ayudan a mantener una correcta proteostasis en un ambiente estresante y son consideradas como chaperonas químicas. Estas moléculas pueden encontrarse en una amplia variedad de organismos o tejidos bajo condiciones desnaturalizantes (Lampel y cols., 2013).

Estas moléculas estabilizan a las proteínas mal plegadas, disminuyen la formación de agregados proteicos previniendo la interacción innecesaria con otras proteínas (Dandage y cols., 2015; Perlmutter, 2002). Aunque las chaperonas químicas pueden rescatar algunas proteínas mal plegadas, no son específicas y pueden incrementar la secreción o retención intracelular de diferentes proteínas en los compartimentos celulares, provocando cambios inapropiados en la concentración de muchas proteínas, comprometiendo la función celular (Ulloa-Aguirre y cols., 2015).

Las chaperonas químicas se dividen en dos grupos: osmolitos y compuestos hidrofóbicos (fenilbutirato de sodio (PBA) y lípidos) (Gaestel, 2006). Estas moléculas usualmente tienen efecto a altas concentraciones (molar), por esta razón han sido rechazadas como agentes terapéuticos. Sin embargo, recientemente algunas de estas moléculas están recibiendo una mayor atención como tratamientos potenciales para condiciones neurodegenerativas debido a sus complejos mecanismos de acción que actúan en diferentes niveles de la cascada neuropatológica (Cortez y Sim, 2014).

Los osmolitos son moléculas expresadas en respuesta al estrés como la fluctuación de la salinidad, desecación o temperaturas extremas (Yancey y cols., 1982). La mayoría de los osmolitos en los eucariotas están restringidos a algunas clases de compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos libres y sus derivados: glicina, taurina, β -alanina), polioles (glicerol, sucrosa) y metilaminas (óxido de trimetilamina (TMAO)).

Bajo condiciones desnaturalizantes, el medio intracelular está enriquecido con osmolitos orgánicos para incrementar la estabilidad de las proteínas sin afectar su actividad. Se puede decir que algunos osmolitos están involucrados con condiciones de estrés específicos. Por ejemplo, los polioles protegen a la célula de temperaturas extremas y deshidratación, los aminoácidos la protegen de ambientes con una concentración alta en sales y las metilaminas, presentes en células ricas en urea, las protegen de los efectos dañinos que tiene la urea sobre la estructura de las proteínas (Yancey y cols., 1982).

A pesar de estas diferencias, los osmolitos comparten el mismo mecanismo no selectivo para estabilizar la estructura de las proteínas, alterando las propiedades disolventes. Dado que la estructura central de un péptido es hidrofílica, pero las cadenas laterales de aminoácidos varían en su hidrofobicidad se induce un equilibrio en la interacción de la estructura central y las cadenas laterales al estar en contacto con un determinado solvente, que determina la energía libre de un estado plegado o no plegado. Los osmolitos secuestran las moléculas de agua, dejando un ambiente hidrofóbico alrededor de la proteína. Esto incrementa la energía libre del estado de la proteína no plegada más que su estado plegado. De esta forma, hay cambios en el equilibrio del estado de la proteína plegada-no plegada hacia el estado plegado, donde la estructura central hidrofílica de la proteína minimiza exposición a sus alrededores hidrofóbicos (Baskakov y Bolen, 1998; Lin y Timasheff, 1994). Además, se ha demostrado que los osmolitos modulan la función de las chaperonas moleculares como las proteínas de la familia Hsp (Diamant y cols., 2001; Street y cols., 2010).

Diversos estudios muestran que osmolitos como el glicerol pueden rescatar la conformación y/o función de proteínas mal plegadas; por ejemplo en 2011 Lijie Ma y colaboradores reportaron el rescate de las mutaciones C126R y C217G en la proteína Tamm-Horsfall, causantes de diversas patologías en el riñón (nefropatía hiperuricémica juvenil familiar, enfermedad renal quística medular tipo II y enfermedad glomeruloquística (Bleyer y cols., 2010; Cameron y Simmonds, 2005; Scolari y cols., 2004)). Las mutaciones fueron expresadas en células de riñón canino Madin-Darby y su localización fue restaurada con 1% de glicerol y disminuyendo la temperatura de los cultivos a 30°C (Ma y cols., 2012).

2.2.3 Otras formas de afectar el plegamiento proteico

Así mismo, se ha analizado el efecto de factores físicos como cambios en la temperatura sobre la fluidez de la membrana plasmática. Se ha demostrado que a bajas temperaturas las colas de los fosfolípidos se vuelven más rígidas y el movimiento se reduce, produciendo una disminución en la permeabilidad de la membrana, mientras que al aumentar la temperatura los fosfolípidos son menos

rígidos y el movimiento se reduce, aumentando la permeabilidad. Estos cambios en la fluidez de la membrana pueden modificar las interacciones de los lípidos con las proteínas de membrana, por lo tanto, se ha usado como una estrategia de rescate para proteínas mal plegadas.

En 2008 Reuter y colaboradores analizaron mediante inmunofluorescencia el efecto de la temperatura (27°C) sobre la localización de diferentes mutantes del canal CNG. Mostrando un aumento en la expresión en membrana plasmática de las mutantes CNG_{F547L}, CNG_{G557R}, CNG_{E228K}, CNG_{R283Q} y CNG_{R439W} como se muestra en la Figura 5 (Reuter y cols., 2008).

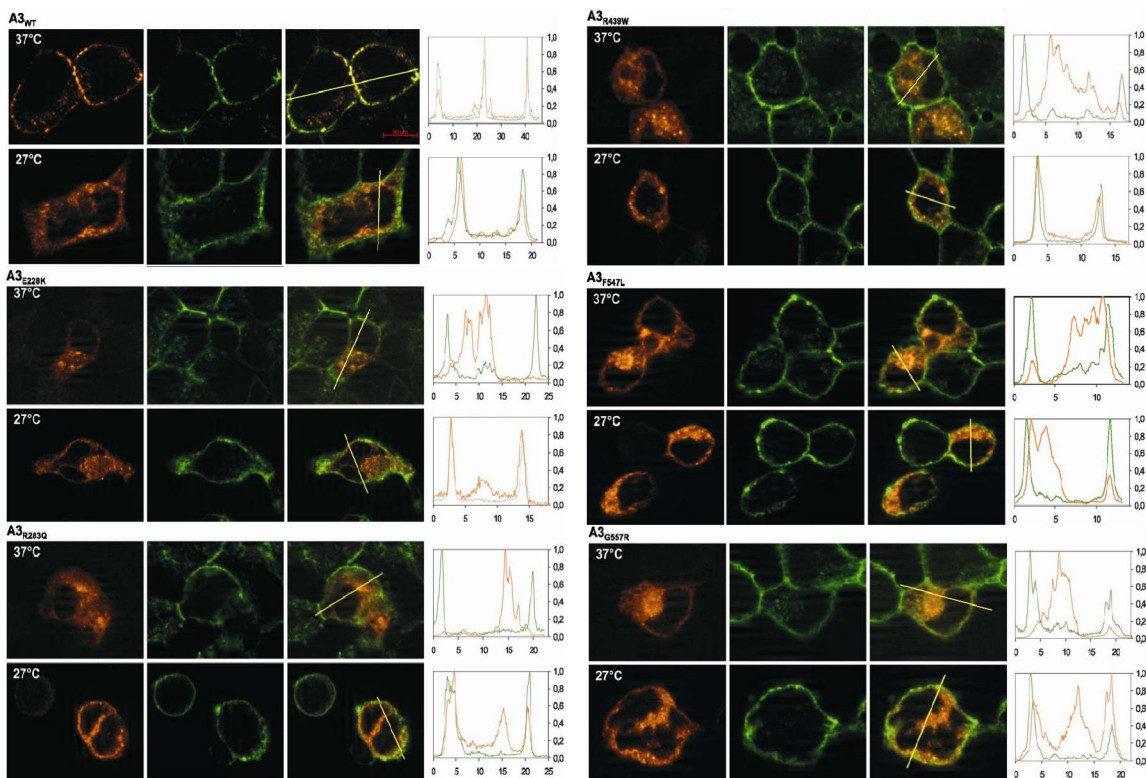


Figura 5. Localización de los canales CNG mutantes y silvestre en células HEK-293. Micrografías de células HEK-293 incubadas a 37°C y 27°C. Los canales CNG fueron marcados con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-660 (color naranja) como se muestra en la primera columna, mientras que la membrana plasmática fue marcada con WGA-Alexa Fluor 488 (color verde) en la segunda columna. El traslape de ambas imágenes se presenta en la tercer columna. Las líneas amarillas en las imágenes traslapadas indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia de los dos fluoróforos. Las intensidades de fluorescencia se midieron en 5 a 8 secciones a lo largo de las células a una distancia de 0.3-0.5 μm y fueron promediadas y normalizadas (eje x), graficando contra la distancia (eje y) en color verde el WGA-Alexa Fluor 488 y en color naranja Alexa Fluor-660, como se muestra en la columna 4.

Diversos estudios demuestran que las chaperonas juegan un papel muy importante en la estabilización de proteínas mal plegadas, acompañándolas durante su translocación, degradación y plegamiento, aunque su efecto parece ser dependiente del estado fisiológico de la célula y de la proteína blanco. Dado que pare establecer estrategias de rescate basadas en el uso de chaperonas es necesario analizar el efecto sobre las proteínas de interés; por lo tanto, en este trabajo se propone el uso de Hsp70, glicerol y cambios en la temperatura para rescatar la localización de las proteínas CNG mutantes: S316F, I384T y R424H, evidenciadas en pacientes con retinitis pigmentosa.

III. JUSTIFICACIÓN

Diversas enfermedades son el resultado de problemas en el direccionamiento de proteínas, las cuales se ubican en algún compartimiento diferente al que normalmente ejecutan su acción. Recuperando la localización de las proteínas mutantes se podría facilitar el rescate de la función proteica.

IV. HIPÓTESIS

La estructura de las proteínas mutantes S316F, I384T y R424H del canal CNG se modifica al afectar la fluidez de la membrana plasmática mediante cambios en la temperatura, incrementando la concentración de precursores lipídicos como el glicerol o sobre-expresando la proteína Hsp70; afectando así la localización y función de los canales mutantes.

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la temperatura, el glicerol y la proteína Hsp70 sobre la localización y la función de los canales CNG mutantes: S316F, I384T y R424H; expresados en cultivos de células HEK-293.

5.1. Objetivos específicos

1. Inducir las mutaciones S316F, I384T y R424H sobre el canal CNG-GFP.
2. Determinar la localización de los canales CNG mutantes y silvestre mediante microscopía de fluorescencia, en células HEK-293.
3. Probar el efecto de la temperatura, el glicerol y la proteína Hsp70 sobre la localización y función de los canales CNG mutantes y silvestre, expresados en células HEK-293.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada para el desarrollo de este proyecto se resume en la Figura 6.

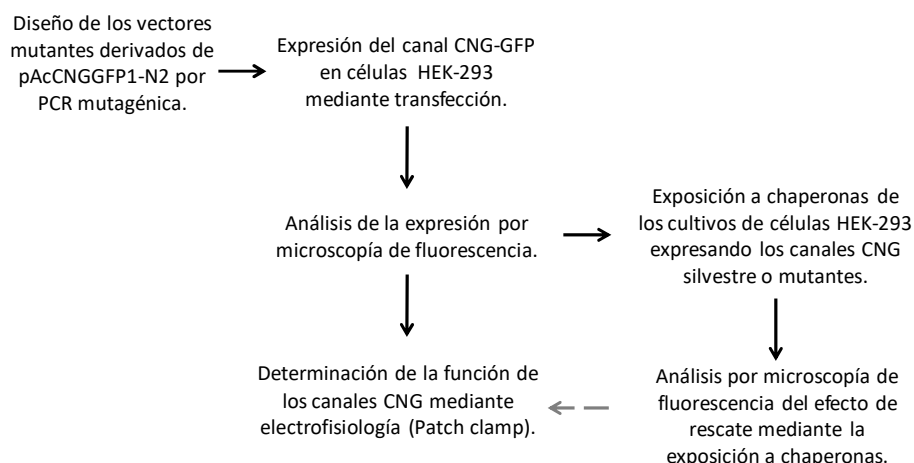


Figura 6. Estrategia general. Después de que se indujeron las mutaciones S316F, I384T y R424H mediante PCR mutagénica usando como molde el vector pAcCNGGFP1-N2, se realizó una transfección en células HEK-293, para enseguida analizar la expresión del canal CNG fusionado a la proteína verde fluorescente (CNG-GFP) mediante microscopía de fluorescencia. Una vez determinada la localización celular de los canales CNG mutantes y silvestre se determinó su función mediante la técnica electrofisiológica de Patch clamp en la modalidad de célula completa (whole-cell). Después se procedió a exponer los cultivos celulares expresando las proteínas de interés a las chaperonas (incubando los cultivos a 27°C o co-transfectando con un vector que expresa la proteína chaperona Hsp70 o suplementando el medio de cultivo con glicerol) y se analizó el efecto en su localización proteica. En el caso de que las chaperonas induzcan un cambio significativo en la localización de los canales mutantes, se propuso analizar el efecto en su función mediante técnicas electrofisiológicas.

6.2.1. PCR mutagénica

Siguiendo las indicaciones de la casa comercial Stratagene, los oligonucleótidos mutagénicos fueron diseñados con el sitio web de QuikChange Primer Design Program, disponible en línea: www.agilent.com/genomics/qcpd (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos mutagénicos.

Mutación	Primer #1 (Sentido)	Primer #2 (Antisentido)
R424H	gcaatacatgcatttcataatgtaagc	gcttacattatgaaaatgcatgtattgc
S316F	gcgctgtgtactctttattccaagc	gcttggaataaagaagtacacagacgc
I384T	gtaacataggtctatgattccaacatgaatg	cattcatgttggaatcatagaacctatgttac

La mezcla de reacción de PCR fue preparada como se indica a en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la reacción para PCR.

Volumen	Reactivo
5.0 µl	Buffer 10X
1.0 µl (10 ng)	ADN
1.0 µl (25ng)	Oligonucleótido sentido
1.0 µl (25ng)	Oligonucleótido antisentido
1.0 µl	dNTP mix
1.5 µl	Quick Solution
1.0 µl	<i>Pfu</i> polimerasa
39.5 µl	H ₂ O _m Q

La mezcla de reacción fue enseguida colocada en un termociclador DLAB TC1000-S usando el protocolo descrito en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de PCR mutagénica.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2min
2	18	95°C	20seg
		60°C	10seg
		68°C	2:30min
3	1	68°C	5min

Una vez concluida la reacción de PCR con la finalidad de eliminar las copias de ADN plasmídico (ADNp) no mutagénicas se añadieron directamente a cada producto amplificado, 2 μ l de la enzima de restricción dependiente de metilación *DpnI* y los productos fueron incubados a 37°C durante 5 min. Enseguida se procedió a transformar las copias de vector mutagénico en bacterias calcio-competentes.

6.3. Transformación de bacterias TOP10 gold.

Para la propagación de los vectores mutagénicos las bacterias TOP10 gold fueron previamente procesadas (por la casa comercial Stratagene) con cloruro de calcio para favorecer su competencia.

Se agregaron 4 μ l de vector mutagénico pAcCNGGFP1-N2 de interés a un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 50 μ l de bacterias TOP10 gold calcio-competentes y a la mezcla se le indujo un choque térmico incubado en hielo por 20 min para incubar enseguida las células por 1 minuto a 42°C y después colocarlas en hielo por 3 minutos. Después para inducir la recuperación celular se agregó 1 ml de medio LB (10 gr de triptona, 10 gr. NaCl, 5 gr de extracto de levadura, 20 gr de agarosa/ litro) y se incubó el cultivo bacteriano por 1 hora a 37°C con una agitación de 150 rpm. Después se procedió a sembrar 100 μ l del cultivo celular en una caja Petri conteniendo LB agar adicionado con 50 μ g/ml de Kanamicina (medio LB más 20 gr de agarosa), enseguida se incubó la placa del cultivo a 37°C por 20 horas.

Las clonas candidatas positivas, se seleccionaron considerando su crecimiento en el agar con antibiótico. Se levantaron tres colonias con un asa bacteriológica para obtener un pre-inoculo a partir de 4 ml de medio LB enriquecido con Kanamicina; incubando por 20 horas con 250 rpm. El producto obtenido se utilizó para la extracción de ADNp.

6.4. Extracción de ADN plasmídico

6.4.1 Miniprep

La extracción del ADN plasmídico (ADNp) en pequeña escala (miniprep) se usó para preparar los ADNp enviados a secuenciación. Se llevó a cabo usando el estuche QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN siguiendo las indicaciones de la casa comercial que a continuación se describen.

Los tubos conteniendo 4 ml de un cultivo fresco de las bacterias acarreando el vector de interés se centrifugaron por 4 min a 4000 rpm, para después decantar el sobrenadante y resuspender en un tubo eppendorf el precipitado celular en 250 μ l del buffer P1 (Tris-Cl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 μ g/ml) y luego añadir 250 μ l del buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) mezclando gentilmente de 4 a 6 veces, agregando enseguida 350 μ l del buffer N3 (Acetato de potasio 3.0 M, pH 5.0) y mezclar por inversión unas 10 veces. Después la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min para enseguida transferir 800 μ l del sobrenadante a la columna de afinidad que se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm. Posteriormente se lavó la columna con 750 μ l de buffer PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% etanol) y se volvió a centrifugar por un min, se desechó el filtrado y se realizó una centrifugación adicional de la columna sola por un minuto para remover los residuos del buffer.

Finalmente se sustituyó el tubo colector por un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 50 μ l de agua mili Q a la columna, centrifugando por 1 min para obtener el ADNp resuspendido.

6.4.2 Midiprep

Este protocolo se refiere a la obtención de ADNp a mediana escala. Se usó con la finalidad de tener mayor cantidad y concentración de ADNp que sirviera para la transfección de los cultivos celulares. Se desarrolló usando el estuche de extracción de ADNp Plasmid Midi Kit, QIAGEN. El protocolo empleado se describe enseguida.

El cultivo de bacterias *E. coli* DH5 α obtenido durante la transformación de los vectores se propagó en un matraz de 50 ml conteniendo 25 ml de medio LB más Kanamicina (50 μ g/ml) después de 20 h de incubación a 37°C con agitación constante, el cultivo se centrifugó por 15 min a 4000 rpm. Después se desechó el sobrenadante, re-suspendiendo el precipitado con 4 ml de buffer P1 (Tris-Cl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, RNasa A 100 μ g/ml), para enseguida agregar 4 ml del buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) y mezclando gentilmente por inversión de 4 a 6 veces. Después se añadieron 4 ml de buffer P3 (Acetato de potasio 1.0 M, pH 5.5) enfriado previamente y se mezcló por inversión gentil 4 a 6 veces para luego incubar en hielo por 15 min. Se procedió a centrifugar por 30 min a 13,000 rpm a 4°C. Posteriormente se añadieron 4 ml de buffer QBT (NaCl 750 mM, pH 7.0; isopropanol al 15% y tritón X-100 al 0.15%) a la columna y se dejó filtrar por gravedad. Una vez que se filtró completamente el buffer QBT, se aplicó el sobrenadante de la centrifugación a la columna y se dejó filtrar por gravedad. Enseguida se desechó el filtrado y se lavó la columna dos veces con 10 ml de buffer QC (NaCl 1.0 M; MOPS 50 mM, pH 7.0 e isopropanol al 15%).

Se desechó el tubo colector y se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo. Luego, el ADN se eluyó con 5 ml de buffer QF (NaCl 1.0 M, Tris-Cl 50 mM, pH 8.5 e isopropanol al 15%). Al ADN recuperado se le agregaron 3.5 ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente para enseguida centrifugar por 30 min a 13,000 rpm, después de decantar el sobrenadante se agregaron 2 ml de etanol al 70% para centrifugar nuevamente por 10 min a 13,000 rpm. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 2 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente, se volvió a centrifugar por 10 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar la pastilla de ADN por 5 a 10 min y se resuspendió el ADN en 50 μ l de agua miliQ. La calidad de la muestra de los ADNp obtenidos de la extracción a pequeña y mediana escala se determinó mediante una electroforesis horizontal, usando un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green.

6.5. Secuenciación.

Las muestras fueron enviadas a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM *campus* Cuernavaca y se secuenciaron usando el método de Sanger, para después determinar la inducción de las secuencias mutagénicas de interés usando el programa computacional Chromas Lite 2.0 <http://chromas-lite.software.informer.com/>.

6.6. Transfección de células HEK-293 con el vector pACNGGFP-N2 silvestre o mutagénico.

La transfección se hizo en placas con fondo de vidrio, incluyendo en cada placa un control negativo (células no transfectadas). Las transfecciones se realizaron siguiendo las indicaciones de la casa comercial del reactivo Lipofectamine 2000 de Thermo Fisher Scientific.

Usando frascos de cultivo conteniendo células HEK-293 crecidas en medio DMEM (GIBCO CAS. 12100-061) suplementado con 5% de suero bovino fetal y antibióticos (Gibco™ Penicilina-estreptomina (10.000 U/ml) a una confluencia de 8-90% en los cultivos, se realizó una resiembra en placas de 96 pocillos con fondo de vidrio y se dejó incubar los cultivos por 24 horas a 37°C con una atmosfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Cuando las células cultivadas alcanzaron una confluencia mayor al 50% se procedió a cambiar el medio de cultivo suplementado por medio DMEM sin suplementar para proceder a realizarla transfección. Se diluyeron 4 µl del reactivo Lipofectamine 2000 en 50 µl de Opti-MEM (Gibco™ Opti-MEM™ Reduced Serum Medium) y de forma separada se diluyeron 100 ng de ADNp con 50 µl de Opti-MEM. Ambas muestras se agitaron brevemente usando el vortex y luego se incubaron por 5 min a temperatura ambiente; en seguida se mezcló y agitó en el vortex el producto de las dos reacciones anteriormente referidas, para obtener un volumen aproximado de 100 µl, el cual se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. 4 horas después de la transfección, se les cambió el medio a los cultivos celulares por medio DMEM suplementado.

6.7. Determinación de la localización de las proteínas CNG en células HEK-293.

La eficiencia de las transfecciones se analizó utilizando el microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse TS2 analizando la expresión de la fusión CNG-GFP al exponer los cultivos celulares con un haz de luz a 475 nm excitación /505 nm de emisión, utilizando el objetivo de 20x. Realizando un análisis preliminar de la estabilidad del cultivo celular y de la expresión y la localización celular de la proteína CNG-GFP silvestre o mutante cada 24 h después de la transfección hasta las 72 h.

6.8. Inducción del efecto de rescate mediante la exposición a chaperonas.

Una vez que se determinó la expresión del canal CNG silvestre y mutante, los cultivos fueron suplementados con diferentes concentraciones de glicerol (1.25%, 2.5% y 5%) incubados a 37°C. Así mismo se analizó el efecto de la temperatura (27°C) sobre la localización de los canales CNG silvestre y mutantes mediante microscopía de fluorescencia 48 h después de la transfección.

Para evaluar el efecto de la proteína Hsp70, los cultivos fueron co-transfectados con los vectores pAcCNGGFP1-N2 expresando las mutaciones S316F, I384T y R424H y pCherry_Hsp70 (Figura 8) y la localización de los canales CNG se analizó por microscopía de fluorescencia.

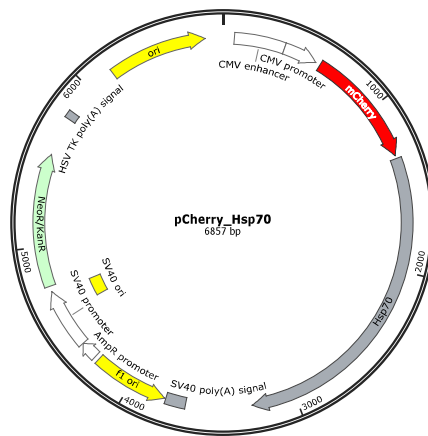


Figura 8. Vector pCherry_Hsp70. La línea sólida color gris representa los aminoácidos correspondientes a Hsp70 mientras que la línea roja señala la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente, mCherry.

6.9. Electrofisiología

El análisis funcional se realizó en las células HEK-293 expresando las diferentes poblaciones de canales CNG. Las células fueron previamente cultivadas en placas de cultivo conteniendo pequeños cubreobjetos esterilizados y previamente tratados con polylisina (Sigma P8920). Una vez determinada por microscopia de fluorescencia la expresión de la fusión CNG-GFP, se procedió a extraer un cubreobjetos, en condiciones estériles y usando una pinza de disección, transportando el cubreobjetos en una placa de cultivo conteniendo la solución externa que se usó para el registro de corrientes iónicas.

Una vez que se transportó el cubreobjetos desde el cuarto de cultivo celular al de electrofisiología, se colocó el cubreobjetos en la cámara de registro par enseguida enfocar una célula usando el objetivo 10x del microscopio invertido del equipo de electrofisiología.

Las pipetas de registro fueron diseñadas usando vidrio de borosilicato (Harvard Apparatus 30-0068) mediante un puller vertical modelo List Medical L/M-3P-A, procurando que su diámetro fuera entre 8 y 15 μm , con una resistencia medida de 3 a 5 M. Las pipetas se llenaron con la ayuda de una jeringa acoplada a una punta modelo MF28G-5 de World Precision Instruments y conteniendo la siguiente solución (en mM) 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA, a un pH de 7.4, mientras

la solución en el baño fue de 140 NaCl, KCl 5, CaCl₂ 2, HEPES 10, a un pH de 7.39 (Todos los reactivos se obtuvieron de SIGMA). Una vez realizado el sello de la pipeta con la membrana celular, las corrientes fueron monitoreadas a través de la modalidad de whole-cell patch clamp usando el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) y el software pClamp 9.2 (Axon Instruments) capturando las corrientes entre 2.5 y 10 kHz con un filtro paso bajo a 1 o 2 kHz. El sistema fue además conectado a tierra y la captura de corrientes fue favorecida usando un alambre de Ag/AgCl dentro de la pipeta que conectó el sello celular con el amplificador, además se usó un puente de agarosa (2% agarosa en KCl 3 M) para mantener la estabilidad del sistema electrofisiológico. La configuración de whole-cell se obtuvo al dar una pequeña succión a la membrana de la célula para obtener un sello de 1 GΩ. Una vez hecho el parche, se registró la corriente generada fijando el potencial de membrana a 0 mV por 4 ms para enseguida aplicar un pulso a -60 mV por 30 ms regresando 0 mV por 10 ms seguido de incremento a +60 mV (Figura 9).

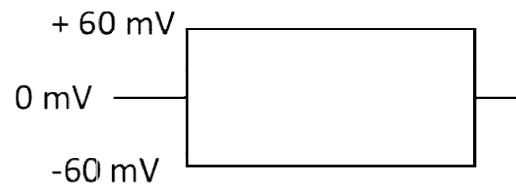


Figura 9. Protocolo para analizar la función de los canales CNG. Se fija el potencial de membrana a 0 mV para aplicar enseguida un pulso a -60 regresando al potencial de membrana para continuar con un incremento de 120 mV.

Para determinar el flujo iónico, las células fueron expuestas a 8-Bromo guanosin monofosfato cíclico (8-Br-GMPc) a una concentración de 2 mM, por ser este análogo de GMPc permeable a la membrana celular.

6.10. Análisis de datos.

Las imágenes serán reconstruidas y analizadas usando el programa Fiji ImageJ <https://fiji.sc>.

Los registros electrofisiológicos fueron generados usando el programa Clampex 9.2.1.9 y los datos fueron obtenidos del programa Clampfit 10.7 para graficar mediante el programa Origin Pro 8.5.

VII. RESULTADOS

7.1. Inducción de las mutantes CNG_{S316F}, CNG_{I384T} y CNG_{R424H}.

Las mutantes S316F, I384T y R424H fueron inducidas por PCR mutagénica en el vector pAcGFP1-N2_CNG el cual cuenta con la secuencia codificante del canal CNG silvestre. La Figura 10 muestra los ADNp obtenidos de las tres mutantes.

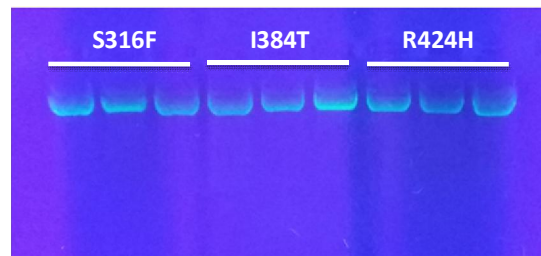


Figura 10. Productos de ADNp de las tres mutantes: S316F, I384T y R424H. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con SYBR Green.

Una vez obtenidos los ADNp fueron enviados a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM *campus* Cuernavaca. En las Figuras 11, 12 y 13 se muestran los electroferogramas resultantes de la secuenciación.

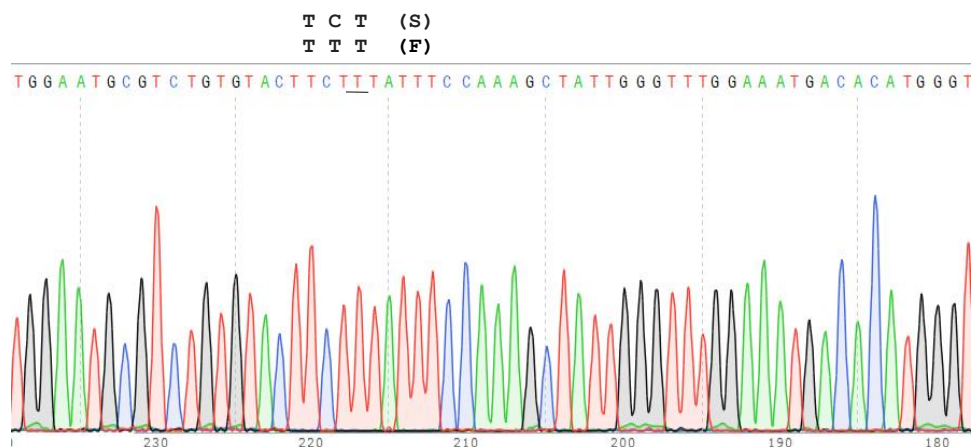


Figura 11. Electroferograma de la inducción de la mutación S316F. Secuencia de la mutación S316F, la cual es un cambio de una serina por una fenilalanina en la posición 316.

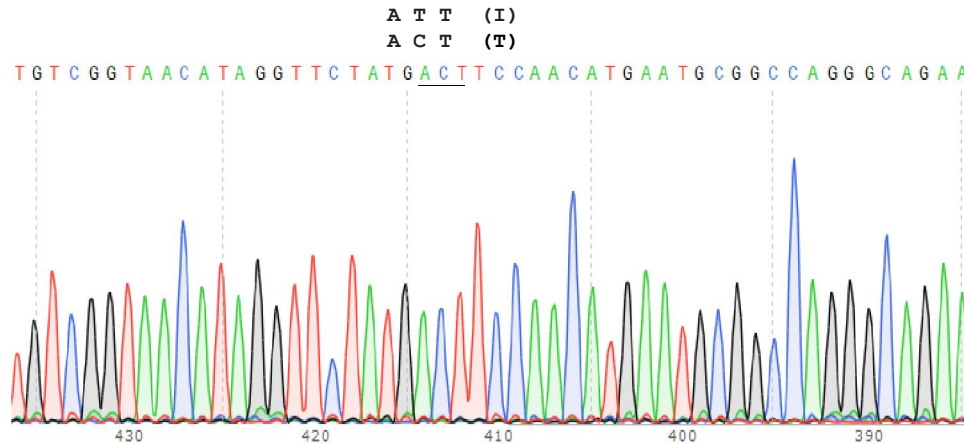


Figura 12. Electroferograma de la inducción de la mutación I384T. Secuencia de la mutación I384T, la cual es un cambio de una isoleucina por una treonina en la posición 384.

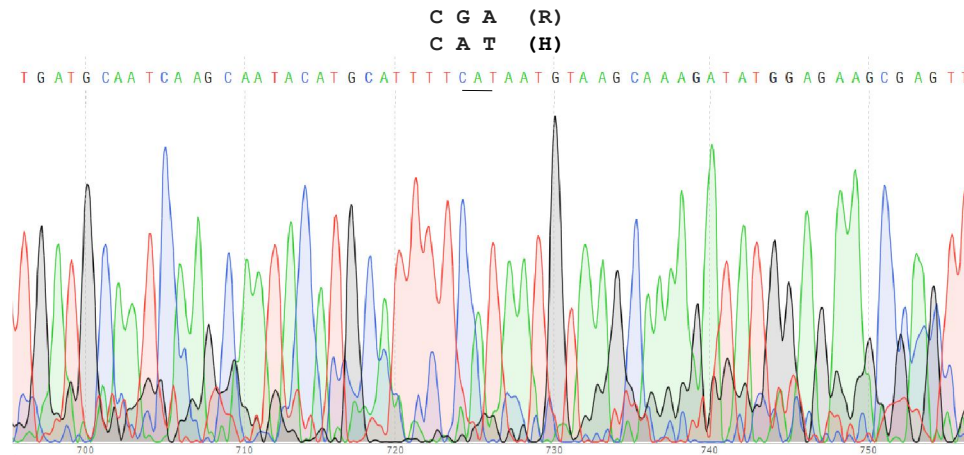


Figura 13. Electroferograma de la inducción de la mutación R424H. Secuencia de la mutación R424H, la cual es un cambio de una arginina por una histidina en la posición 424.

7.2. Análisis de la localización y función de las proteínas CNG mutantes a 37°C.

Para determinar la localización de las proteínas CNG mutantes, las células HEK-293 fueron transfectadas. Los cultivos se incubaron a 37°C y la localización se analizó 48 h después de la transfección. A 37°C el canal CNG silvestre se expresa principalmente en la membrana plasmática, mientras que los canales CNG mutantes tienen mayor expresión intracelular comparada al canal silvestre, aunque si se observa expresión en la membrana plasmática (Figura 14 A y B). La

reducción de la temperatura (27°C) causó un aumento aparente en la expresión de los canales CNG silvestre y mutante sin modificar su localización como se muestra en las gráficas (Figura 14 B). Además, se analizó su función usando la modalidad whole-cell, usando el protocolo descrito en la Figura 9. Con presencia de 8-Br-GMPc (2 mM) los canales CNG silvestre, se activaron, mientras que los canales mutantes permanecieron cerrados, mostrando que no fueron capaces de transportar calcio al interior de la célula (Figura 14 C).

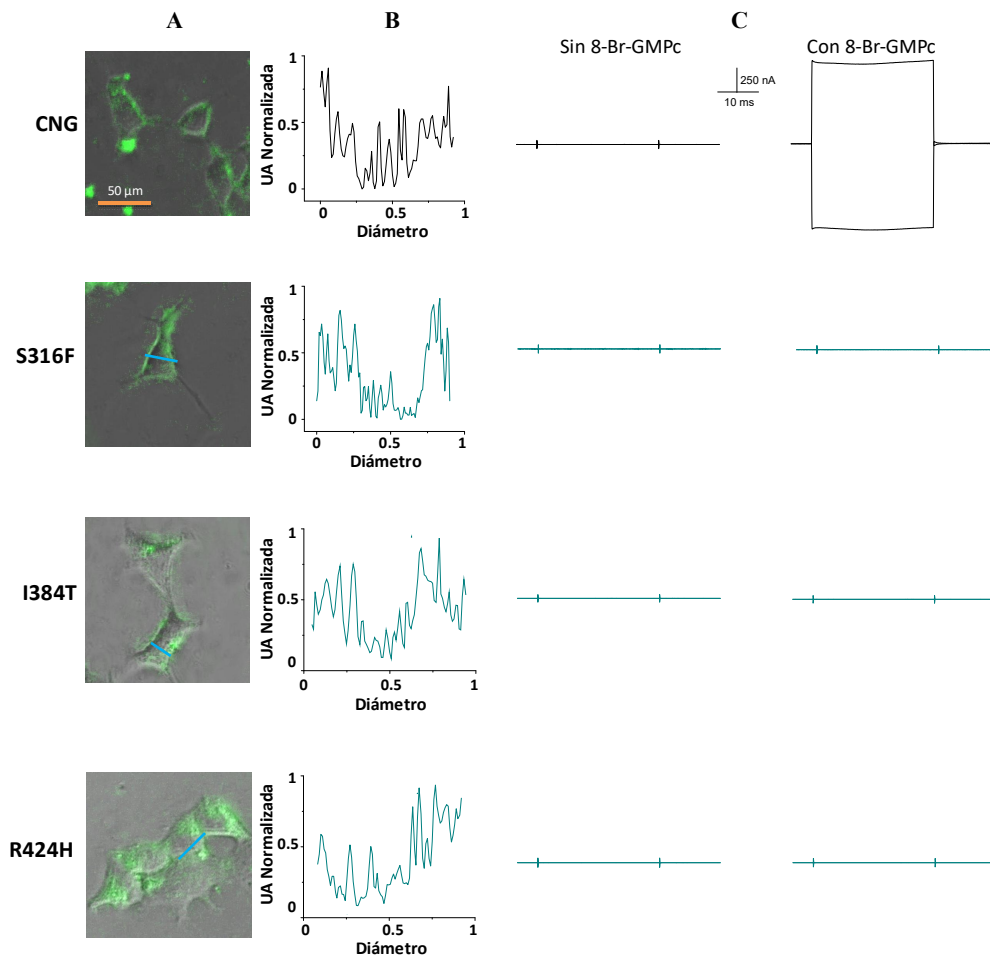


Figura 14. Localización y función de los canales CNG_{S316F} , CNG_{I384T} y CNG_{R424H} . **A.** Micrografías tomadas 48 h después de la transfección a 37°C. **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las imágenes traslapadas indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo (475 nm de excitación/505 nm de emisión), que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x. **C.** Análisis electrofisiológico de los canales CNG en presencia y ausencia de 8-Br-GMPc. Las corrientes fueron registradas mediante la técnica de patch clamp en la configuración whole-cell, fijando el potencial de membrana a 0 mV para enseguida dar un pulso a -60 mV seguido de un incremento de 120 mV para llegar a +60 mV.

7.3. Efecto de la temperatura (27°C) sobre la localización de las proteínas CNG mutantes.

Para determinar la localización de las proteínas CNG mutantes después de que las células HEK-293 fueron transfectadas, los cultivos se incubaron a 27°C y se capturaron micrografías en el microscopio de epifluorescencia 48 h post-transfección (Figura 15). Al comparar la expresión y localización celular de las células expresando canales CNG pero incubadas a 37°C (Figura 15), se observó de manera general que la reducción de temperatura indujo un aumento en la expresión proteica, sin modificar su localización.

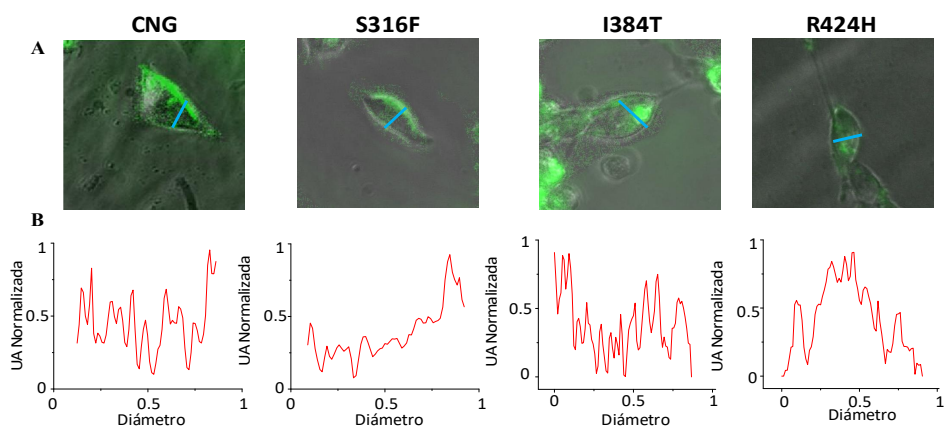


Figura 15. Efecto de la temperatura (27°C) sobre la localización de los canales CNG. A. Micrografías tomadas 48 h después de la transfección a 27°C. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las imágenes traslapadas indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo (475 nm de excitación/505 nm de emisión), que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x.

7.4. Efecto del glicerol sobre la localización de las proteínas CNG mutantes.

Se analizó el efecto de diferentes concentraciones de glicerol sobre la localización de las proteínas CNG mutantes y silvestre como se muestra en las siguientes figuras (Figuras 16-18).

El glicerol (1.25 y 2.5%) no ocasionó cambios en la localización del canal CNG silvestre, sin embargo el 5% de glicerol resultó tóxico para las células (Figura 16).

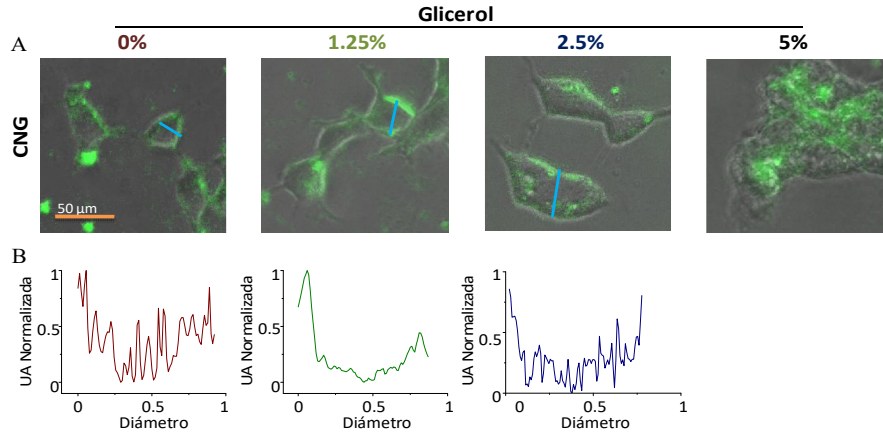


Figura 16. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG silvestre. **A.** Micrografías obtenidas al exponer las células a un haz de luz a 475 nm de excitación/ 505 nm de emisión. Las células fueron incubadas a 37°C y el medio fue adicionado con diferentes concentraciones de glicerol. **B.** Cuantificación de intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las micrografías indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo, que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x.

El 1.25, 2.5 y 5% de glicerol aumentaron la expresión de la mutante CNG_{S316F}, sin mejorar su expresión en membrana (Figura 17).

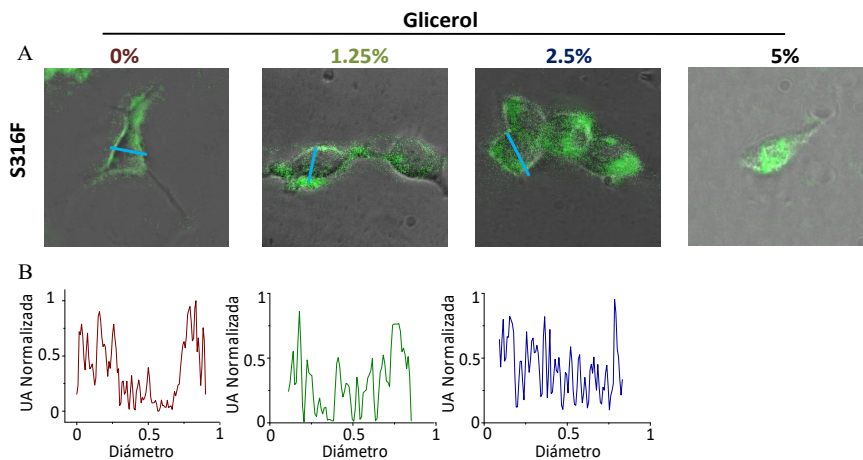


Figura 17. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG_{S316F}. **A.** Micrografías obtenidas al exponer las células a un haz de luz a 475 nm de excitación/ 505 nm de emisión. Las células fueron incubadas a 37°C y el medio fue adicionado con diferentes concentraciones de glicerol. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las micrografías indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo, que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x.

La expresión de la mutante CNG_{I384T} se vió aumentada con el glicerol (1.25 y 2.5%), pero no hubo cambio en la localización de la proteína. La concentración mas alta de glicerol (5%) resultó tóxica para los cultivos ya que fue evidente la propención celular a formar cumulos y perder su morfología, observando además muerte celular (Figura 18).

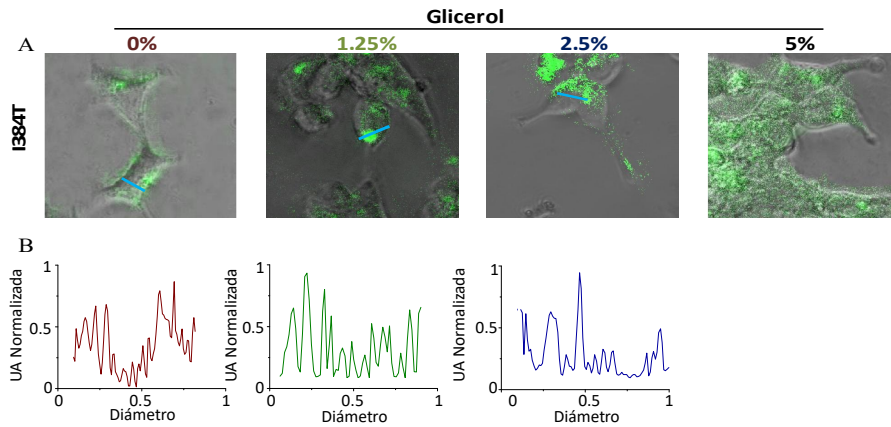


Figura 18. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG_{I384T}. **A.** Micrografías obtenidas al exponer las células a un haz de luz a 475 nm de excitación/ 505 nm de emisión. Las células fueron incubadas a 37°C y el medio fue adicionado con diferentes concentraciones de glicerol. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las micrografías indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo, que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x.

El glicerol (1.25 y 2.5%) causó un aumento en la expresión del canal mutante CNG_{R424H}, pero su localización no se vio afectada. El 5% de glicerol fue tóxico para las células (Figura 19).

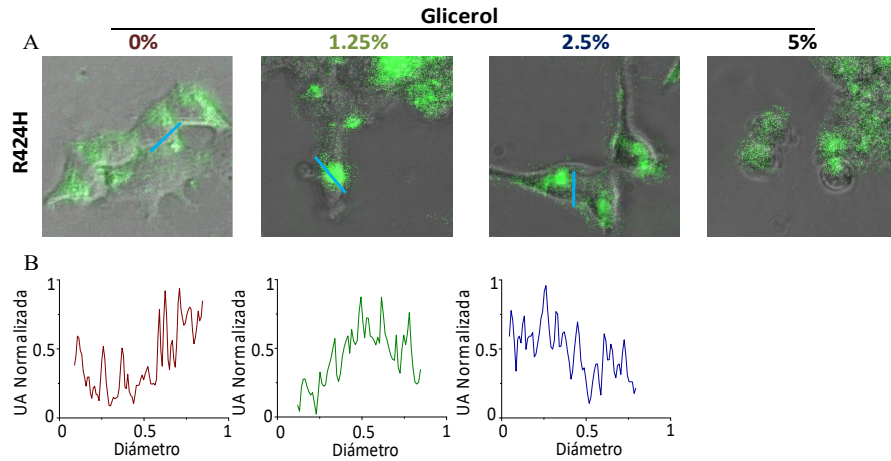


Figura 19. Efecto del glicerol sobre la localización del canal CNG_{R424H}. **A.** Micrografías obtenidas al exponer las células a un haz de luz a 475 nm de excitación/ 505 nm de emisión. Las células fueron incubadas a 37°C y el medio fue adicionado con diferentes concentraciones de glicerol. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Las líneas azules en las micrografías indican el eje en el cual se determinaron las intensidades de fluorescencia del fluoróforo, que fueron promediadas y normalizadas (eje x) y se graficaron contra la distancia (eje y), usando el programa Fiji ImageJ. Objetivo 20x.

7.5. Efecto de la chaperona Hsp70 sobre la localización de las proteínas CNG mutantes.

Antes de analizar el efecto de la sobre-expresión de Hsp70 sobre la localización de los canales CNG, primero se transfectó el vector pEGFP_Hsp70 (Figura 20) sobre los cultivos celulares con la finalidad de analizar su efecto sobre las células HEK-293. De manera que la sobre-expresión de esta chaperona está dada por choques térmicos, las células fueron incubadas a 27 y 42°C (Figura 21).

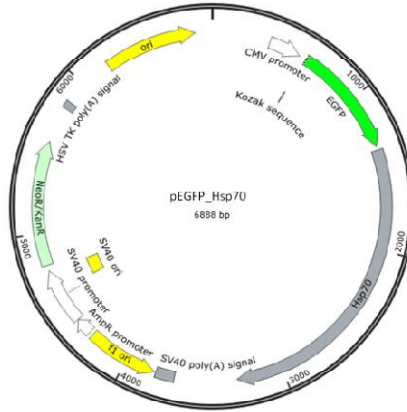


Figura 20. Vector pEGFP_Hsp70. La línea sólida color gris representa los aminoácidos correspondientes a Hsp70, mientras que la línea verde señala la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP).

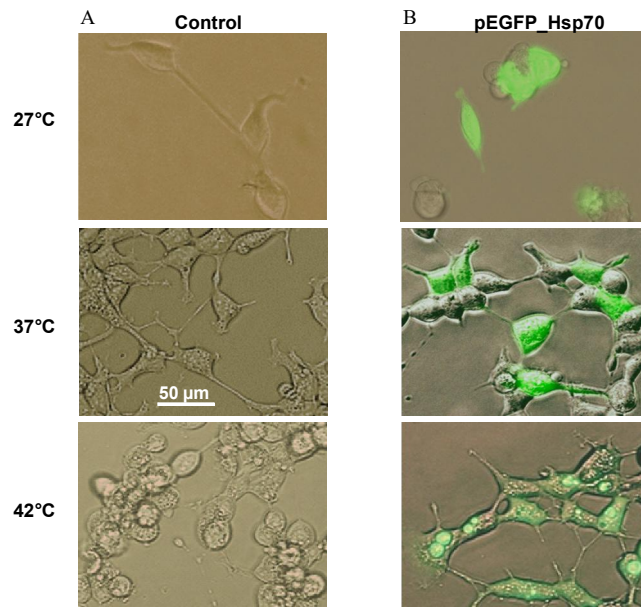


Figura 21. Sobre-expresión de la chaperona Hsp70 en cultivos de células HEK-293. Las células HEK-293 fueron incubadas a diferentes temperaturas (27, 37 y 42°C). **A.** Células sin transfectar. **B.** Se muestra el traslape de las micrografías en campo claro y oscuro, expresando la chaperona Hsp70. Objetivo 20x.

La sobre-expresión de Hsp70 no resultó tóxica para los cultivos y por el contrario, tuvo un efecto protector para las células al incubarlas a 42°C en comparación de las células control que no fueron transfectadas. Además, la reducción en la temperatura (27°C) no resultó dañina para las células como se muestra en ambas micrografías (control y células expresando el vector pEGFP_Hsp70).

Una vez analizada la expresión de Hsp70, las células fueron co-transfectadas con el vector pCherry_Hsp70 y pAcCNGGFP1-N2 expresando el canal silvestre y las mutantes, como se muestra en la Figura 21.

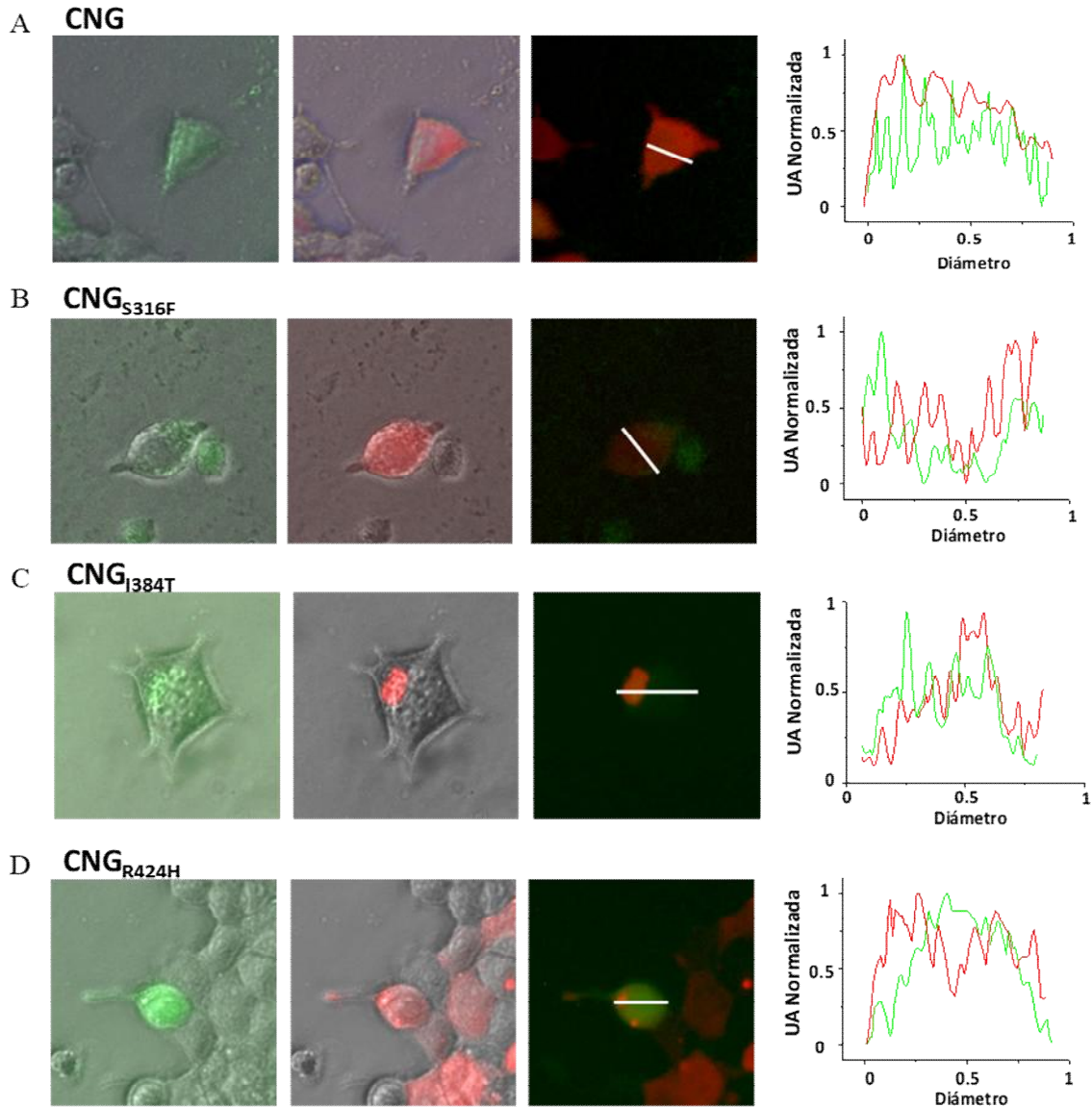


Figura 22. Co-expresión de los canales CNG (mutantes y silvestre) y la chaperona Hsp70. A. Las células HEK-293 fueron co-transfectadas con los vectores expresando canales CNG silvestre y B, C y D mutantes y la chaperona Hsp70. En la primera columna se muestra la expresión de los canales CNG (475 nm de excitación/505 nm de emisión) y la expresión de Hsp70 es mostrada en la segunda columna (587 nm de excitación/610 nm de emisión). Se realizó un traslape de ambas micrografías (columna 3) y se analizó la intensidad de los puntos de fluorescencia de ambas proteínas usando el programa Fiji ImageJ (columna 4). En color verde se muestran los picos de fluorescencia de los canales CNG y en color rojo se muestran los de la chaperona Hsp70.

La co-expresión con Hsp70 no favoreció la localización de los canales CNG mutantes en membrana plasmática, únicamente acorde al análisis óptico favoreció un aumento su expresión. Sería interesante cuantificar la expresión proteica en futuros experimentos.

VIII. DISCUSIÓN

En pacientes con retinopatías sólo se han evidenciado tres mutaciones que inducen un cambio aminoacídico (S316F, I384T y R424H) en la subunidad alfa 1 (hCNGA1) del canal CNG. Estas mutaciones han sido asociadas a retinitis pigmentosa, un tipo de retinitis donde se hace evidente la acumulación de proteínas en la parte posterior del ojo, en la región correspondiente a la retina. De las mutaciones anteriormente mencionadas, sólo una de ellas se ha estudiado funcionalmente. Dryja y colaboradores en 1995 reportaron resultados sobre la localización y función de la mutante S316F, pero los datos no son claros ya que aunque ellos reportan que no fue posible rescatar la función proteica, se muestra corriente unitaria en células suplementadas con glicerol en respuesta a la adición de GMPc, lo cual es contradictorio ya que el canal no tratado no muestra corriente (Figura 4) (Dryja y cols., 1995). Por lo tanto, en este trabajo como una alternativa para el diseño de rescate de proteínas con defecto de tráfico, se buscó analizar la localización proteica de estas tres mutantes del canal CNGA1, comparando la localización de la fusión canal CNG-GFP silvestre o mutante en células HEK-293, determinando además el efecto de diferentes chaperonas (incluyendo el glicerol) sobre su localización celular.

Se analizó la expresión de los canales CNG silvestre y mutante 48 h después de la transfección. Al incubar las células HEK-293 a 37°C, se encontró el canal CNG principalmente en la membrana plasmática. Mientras que las proteínas mutantes presentan mayor retención intracelular, además de encontrarse también en la membrana. Esto se puede deber al posible cambio en la estructura e interacciones de los aminoácidos mutados. Para el caso de la mutante S316F, el cambio por

fenilalanina podría generar un aumento en el tamaño de la estructura, debido a que, a diferencia de la serina, este aminoácido tiene un anillo. Y ocurre algo similar en la mutante R424H, aunque ambos son aminoácidos cargados positivamente, la histidina está agregando un anillo a la estructura. Por otra parte, para la mutante I384T se cambia una cadena lateral hidrofóbica (I) por una hidrofílica (T). Argel Estrada Mondragón de la Universidad Linköping de Suecia, a petición personal realizó un modelado de hCNGA1 y de las mutantes a partir de CeCNG (5H3O) (Anexo 1) y posteriormente se calcularon y analizaron las distancias del carbono central de cada residuo aminoacídico en el canal silvestre (S316, I384 y R424) y de los residuos mutantes (F316, T384 y H424). El análisis de las estructuras modeladas muestra que no hubo un cambio significativo entre las distancias de las dos subunidades paralelas de los residuos mutantes F316 y T384; considerando el tetrámero formado por las subunidades: A, B, C y D (de B a D 49.86 Å y de A a C 50.76; de B a D 27.25 Å y de A a C 27.60 Å, respectivamente), comparada con los residuos silvestres S316 e I384 (de B a D 49.97 y de A a C 50.14; de B a D 25.93 y de A a C 25.28 Å, respectivamente). Sin embargo, el cambio de una arginina por una histidina en la posición 424 aumentó la distancia aproximadamente 5 Å, correspondiente a 52.70 de B a D y 52.07 Å de A a C para la subunidad silvestre; y 57.09 de B a D y 57.05 de A a C para la mutante (Anexo 2).

Uno de los aspectos principales para el correcto funcionamiento de los canales CNG es su capacidad para permitir la permeación iónica de Ca^{2+} hacia el interior de la célula a través del poro. Aunque diferentes regiones del poro pueden contribuir a la selectividad del Ca^{2+} , el filtro de selectividad (Anexo 3) que se encuentra en la región más estrecha del poro y está formado por una secuencia altamente conservada de aminoácidos que interactúan específicamente con el ión que pasa, juega un papel clave en el control de la selectividad del canal (Dudev y Lim, 2015).

Debido a que se ha demostrado que la alteración de la estructura o composición del filtro de selectividad genera una pérdida sustancial o total de la función del canal (Kopec y cols., 2019), nos basamos en el modelo hecho por Argel Estrada

para analizar el diámetro de esta zona de los canales CNG mutantes (S316F, I384T y R424H), y se compararon con el del canal CNG silvestre (Figura 23).

Las mutaciones en el canal CNG (S316F, I384T y R424H) modificaron el diámetro del filtro de selectividad, al disminuir o aumentar su tamaño. Este cambio en la estructura causó una pérdida total de la función de los canales mutantes que fue comprobado mediante electrofisiología (Figura 14 C).

Actualmente se han evaluado diferentes estrategias para tratar de rescatar la localización de proteínas mal plegadas. La temperatura a menudo tiene un profundo impacto en la eficiencia del plegamiento en la célula. Una reducción en la temperatura de crecimiento de 37°C a temperatura ambiente mejora notablemente el tráfico de proteínas mal plegadas por ejemplo, en el canal CFTR, el receptor de la hormona luteinizante (LHR) y el canal hERG, entre otras proteínas (Denning y cols., 1992; Jeyaraj y cols., 2002; Zhou, Gong, y January, 1999). En este caso, la disminución de la temperatura de los cultivos (27°C) no tuvo cambios en la expresión de las proteínas CNG silvestre, CNG_{S316F} y CNG_{I384T}. Sin embargo, aumentó la expresión del canal mutante CNG_{R424H}, sin favorecer la localización en membrana. Previos estudios (Lin y cols., 2015) han demostrado que una disminución en la temperatura de los cultivos de células HEK-293 aumenta la expresión 1.5 veces de la proteína GFP, además reduce la tasa de crecimiento de las células, al tiempo que aumenta la productividad celular de las proteínas recombinantes. Diversos estudios sugieren que el efecto de la baja temperatura en la expresión de proteínas es específico de la línea celular y la mejora de la expresión de proteínas está relacionada principalmente con la detención del crecimiento inducida por el frío dentro de la fase S o G1 del ciclo celular (Kaufmann y cols., 1999; Rieder y Cole, 2002; Yoon y cols., 2003).

En los cultivos suplementados con glicerol las concentraciones de 1.25 y 2.5% indujeron un aumento en la sobre-expresión de las proteínas CNG silvestre y mutantes, sin favorecer la localización en membrana plasmática para el caso de las mutantes esto pudiera deberse a que se favoreció la vesiculación y el transporte de proteína inmadura que quedo de alguna manera retenida en el

tráfico celular. La estructura final o conformación adoptada por cualquier cadena de polipéptidos es determinada por consideraciones energéticas: una proteína generalmente se pliega en la forma en que se minimiza su energía libre y de manera indirecta es lo que hacen en general las chaperonas químicas, como el glicerol; alterando las propiedades de los disolventes para estabilizar la estructura de las proteínas. El glicerol secuestra las moléculas de agua, dejando un ambiente hidrofóbico alrededor de la proteína (Baskakov y Bolen, 1998; Lin y Timasheff, 1994). Esto incrementa la energía libre del estado de la proteína no plegada más que su estado plegado. De esta forma, hay cambios en el equilibrio del estado de la proteína hacia el estado plegado. El 5% de glicerol resulto tóxico para los cultivos lo que refleja que los sistemas de control de calidad celular para mantener su estructura y homeostasis son dependientes de la proteína sobre-expresada y su efecto fisiológico.

Sin embargo, como en este caso, las chaperonas químicas (como el glicerol) no siempre son efectivas para rescatar la localización de proteínas mal plegadas, aunque generalmente se asume que, a diferencia de otras chaperonas, el glicerol pudiera estabilizar prácticamente a cualquier proteína debido a que no tiene un sitio de unión específico.

La co-expresión de Hsp70 tuvo un efecto similar al del glicerol sobre los canales CNG silvestre y mutantes, ya que no mejoró la expresión en membrana, sino que aumentó la expresión intracelular proteica. Las chaperonas moleculares, como Hsp70 tiene un papel muy importante en la proteostasis de la célula; a esta proteína se le conoce como la chaperona de triaje, ya que determina el destino de las proteínas cliente influyendo en el plegamiento, desagregación, degradación de proteínas y autofagia, según las necesidades de la célula (Zuiderweg y cols., 2017).

Finalmente, dado que no se observó ningún efecto favorable sobre su localización proteica en membrana plasmática, no se analizó el efecto de las chaperonas sobre la función de los canales mutantes.

IX. CONCLUSIONES

- Se indujeron las mutaciones S316F, I384T y R424H sobre el canal CNG-GFP.
- La modificación estructural inducida por las mutantes CNG_{S316F}, CNG_{I384T} y CNG_{R424H} afectan la vía de permeación iónica e inducen retención intracelular, causando disfunción.
- La retención intracelular de los canales iónicos CNG_{S316F}, CNG_{I384T} y CNG_{R424H} no se rescató al disminuir la temperatura, suplementar con glicerol o sobre-expresar la proteína Hsp70 en los cultivos de células HEK-293.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Akerfelt, M., Morimoto, R., y Sistonen, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;11(8):545–555.

Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y., y Tsumoto, K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2006;1764(11):1677–1687.

Araki, K., y Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect in Biol.* 2011;3(11):a007526–a007526.

Baskakov, I., y Bolen, D. W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J Biol Chem.* 1998;273(9):4831–4834.

Bleyer, A. J., Hart, P. S., y Knoch, S. Hereditary interstitial kidney disease. *Semin Nephrol.* 2010;30(4):366–373.

Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., y Dowhan, W. Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders. *Subcell Biochem.* 2008;49:197–239.

Booth, P. J., Templer, R. H., Meijberg, W., Allen, S. J., Curran, A. R., y Lorch, M. In Vitro Studies of Membrane Protein Folding. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2001;36(6):501–603.

Brehme, M., Voisine, C., Rolland, T., Wachi, S., Soper, J. H., Zhu, Y., Morimoto, I. R. A. Chaperome Sub-Network Safeguards Proteostasis in Aging and Neurodegenerative Disease. *J Cell Rep.* 2014;9(3):1135-50.

Buchner, J., y Kiefhaber, T. *Protein Folding Handbook.* (2008) <https://doi.org/10.1002/9783527619498>

Cameron, J. S., y Simmonds, H. A. Hereditary hyperuricemia and renal disease. *Semin Nephrol.* 2005;25(1):9–18.

Chiang, W. C., Kroeger, H., Sakami, S., Messah, C., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lin, J. H. Robust Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Rhodopsin Precedes Retinal Degeneration. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):679–695.

Choo-Kang, L. R., y Zeitlin, P. L. Induction of HSP70 promotes $\Delta F508$ CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L58–L68.

Cortez, L., y Sim, V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion.* 2014;8(2):1–6.

Cournia, Z., Allen, T. W., Andricioaei, I., Antonny, B., Baum, D., Brannigan, G., y Bondar, A.-N. Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: a Perspective from Experiments and Theory. *J Membr Biol.* 2015;248(4):611–640.

Craig, E. A., Gambill, B. D., y Nelson, R. J. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Protein Biogenesis. 1993;57(2):402–414.

Dandage, R., Bandyopadhyay, A., Jayaraj, G. G., Saxena, K., Dalal, V., Das, A., y Chakraborty, K. Classification of Chemical Chaperones Based on Their Effect on Protein Folding Landscapes. *ACS Chem Biol.* 2015;10(3):813–820.

Denning, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E., y Welsh, M. J. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992;358(6389):761–764.

Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., y Goloubinoff, P. Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *J Biol Chem.* 2001;276(43):39586–39591.

Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(1):3–16.

Douglas, P. M., y Dillin, A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol.* 2010;190(5):719–729.

Dryja, T. P., Finn, J. T., Peng, Y. W., McGee, T. L., Berson, E. L., y Yau, K. W. Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10177–10181.

Dudev T. y Lim C. Ion Selectivity in the Selectivity Filters of Acid-Sensing Ion Channels. *Sci Rep*. 2015; 5:7864.

Duricka, D. L., Brown, R. L., y Varnum, M. D. Defective trafficking of cone photoreceptor CNG channels induces the unfolded protein response and ER-stress-associated cell death. *Biochem J*. 2012;441(2):685–696.

Ellgaard, L., Molinari, M., y Helenius, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*. 1999;286(5446):1882–8.

Ellis, R. J., y Hemmingsen, S. M. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci*. 1989;14(8):339–342.

Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., y Parmeggiani, F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics*. 2011;12(4):238–249.

Fiedler, S., Broecker, J., y Keller, S. Protein folding in membranes. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(11):1779–1798.

Forloni, G., Terreni, L., Bertani, I., Fogliarino, S., Invernizzi, R., Assini, A., y Bertoli, A. Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):957–976.

Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., y Hartl, F. U. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*. 1994;(370):111–117.

Gaestel, M. Molecular Chaperones in Signal Transduction. In K. Starke y M. Gaestel (Eds.), *Molecular Chaperones in Health and Disease*. 2006:93–109. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Genead, M. A., Fishman, G. A., Rha, J., Dubis, A. M., Bonci, D. M. O., Dubra, A., y Carroll, J. Photoreceptor structure and function in patients with congenital achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(10):7298–308.

Gething, M. J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10(5):465–472.

Goldstein. Sensation and Perception. *Psychological Bulletin*. 2013;21(8):435–442.

- González-del Pozo, M., Borrego, S., Barragán, I., Pieras, J. I., Santoyo, J., Matamala, N., y Antiñolo, G. Mutation screening of multiple genes in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa by targeted resequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e27894.
- Hartl, F. U., Bracher, A., y Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475:324-332.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., y Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *The Lancet*. 2006;368(9549):1795–1809.
- Hipp, M. S., Park, S.-H., y Hartl, F. U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*. 2014;24(9):506–514.
- Jeyaraj, S., Chotani, M., Mitra, S., Gregg, H., Flavahan, N., y Morrison, K. Cooling Evokes Redistribution of $\alpha 2C$ -Adrenoceptors from Golgi to Plasma Membrane in Transfected Human Embryonic Kidney 293 Cells. *Mol Pharmacol*. 2002;60:1195–1200.
- Jin, Z.-B., Mandai, M., Yokota, T., Higuchi, K., Ohmori, K., Ohtsuki, F., y Kosugi, S. Identifying pathogenic genetic background of simplex or multiplex retinitis pigmentosa patients: a large scale mutation screening study. *J Med Genet*. 2008;45(7):465–472.
- Kaiser, C. M., Chang, H. C., Agashe, V. R., Lakshminpathy, S. K., Etchells, S. A., Hayer-Hartl, M., y Barral, J. M. Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature*. 2006;444(7118):455–460.
- Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., y Bailey, J. E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 1999;63(5):573–582.
- Kopec W., Rothberg B. y de Groot B. Molecular mechanism of a potassium channel gating through activation gate-selectivity filter coupling. *Nat Commun*. 2019;10:5366.
- Labbadia, J., y Morimoto, R. I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:435–464.
- Lampel, A., Bram, Y., Levy-Sakin, M., Bacharach, E., y Gazit, E. The Effect of Chemical Chaperones on the Assembly and Stability of HIV-1 Capsid Protein. *PLoS ONE*. 2013;8(4):25–29.
- Li, Z., y Srivastava, P. Heat-shock proteins. *Current Protocols in Immunology*. 2004;58:A.1T.1-A.1T.6.
- Lin, C.-Y., Huang, Z., Wen, W., Wu, A., Wang, C., y Niu, L. Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0123562.

Lin, T. Y., y Timasheff, S. N. Why Do Some Organisms Use a Urea-Methylamine Mixture as Osmolyte? Thermodynamic Compensation of Urea and Trimethylamine N-Oxide Interactions with Protein. *Biochem.* 1994;33(42):12695–12701.

Ma, L., Liu, Y., El-Achkar, T. M., y Wu, X.-R. Molecular and Cellular Effects of Tamm-Horsfall Protein Mutations and Their Rescue by Chemical Chaperones. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(2):1290–1305.

Marigo, V. Programmed Cell Death in Retinal Degeneration: Targeting Apoptosis in Photoreceptors as Potential Therapy for Retinal Degeneration. *Cell Cycle.* 2007;6(6):652–655.

Mas, G., y Hiller, S. Conformational plasticity of molecular chaperones involved in periplasmic and outer membrane protein folding. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(13):fny121-fny121.

Matulef, K., y Zagotta, W. N. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 2003;19(1):23–44.

Morello, J. P., Salahpour, A., Laperrière, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., y Bouvier, M. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest.* 2000;105(7):887–895.

Oxenoid, K., Sonnichsen, F. D., y Sanders, C. R. Conformationally specific misfolding of an integral membrane protein. *Biochem.* 2001;40(17):5111–5118.

Paloma, E. Novel homozygous mutation in the alpha subunit of the rod cGMP gated channel (CNGA1) in two Spanish sibs affected with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet.* 2002;39(10):66e–66.

Perlmutter, D. H. Chemical chaperones: A pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res.* 2002;52(6):832–836.

Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., y Walter, P. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 2010;8(7):e1000415–e1000415.

Pobre, K. F. R., Poet, G. J., y Hendershot, L. M. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem.* 2018;294:2098-2108.

Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., y Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(22):2560–2570.

- Reuter, P., Koeppen, K., Ladewig, T., Kohl, S., Baumann, B., Wissinger, B., y Zrenner, E. Mutations in CNGA3 impair trafficking or function of cone cyclic nucleotide-gated channels, resulting in achromatopsia. *Hum Mutat.* 2008;29(10):1228–1236.
- Rieder, C. L., y Cole, R. W. Cold-Shock and the Mammalian Cell Cycle. *Cell Cycle.* 2002;1(3):168–174.
- Scolari, F., Caridi, G., Rampoldi, L., Tardanico, R., Izzi, C., Pirulli, D., y Ghiggeri, G. M. Uromodulin storage diseases: Clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(6):987–999.
- Sousa, R., y Lafer, E. M. Keep the Traffic Moving: Mechanism of the Hsp70 Motor Rui. *Traffic.* 2006;44(12):3516–3521.
- Stone, M. B., Shelby, S. A., Núñez, M. F., Wisser, K., y Veatch, S. L. Protein sorting by lipid phase-like domains supports emergent signaling function in B lymphocyte plasma membranes. *ELife.* 2017;6:e19891.
- Street, T. O., Krukenberg, K. A., Rosgen, J., Bolen, D. W., y Agard, D. A. Osmolyte-induced conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Protein Sci.* 2010;19(1):57–65.
- Ulloa-Aguirre, A., Zarinan, T., y Conn, P. M. Pharmacoperones: targeting therapeutics toward diseases caused by protein misfolding. *Rev Invest Clin.* 2015;67(1):15–19.
- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., y Hartl, F. U. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *CSH Perspect Biol.* 2010;2(12):a004390–a004390.
- Vembar, S. S., y Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews. J Mol Cell Biol.* 2008;9(12):944–957.
- Vincenz-Donnelly, L., y Hipp, M. S. The endoplasmic reticulum: A hub of protein quality control in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2017;108, 383–393.
- Wang, Z., Jiang, Y., Lu, L., Huang, R., Hou, Q., y Shi, F. Molecular mechanisms of cyclic nucleotide-gated ion channel gating. *J Genet Genomics.* 2007;34(6):477–485.
- Whitelegge, J. P. Integral membrane proteins and bilayer proteomics. *Anal Chem.* 2013;85(5):2558–2568.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R., y Somero, G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Sci.* 1982;217(4566):1214–1222.

Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L., y Liu, Q. Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure (London, England:1993)*. 2015;23(12):2191–2203.

Yau, K.-W., y Hardie, R. C.. Phototransduction Motifs and Variations. *NIH Public Access*. 2010;139(2):246–264.

Yin, H., y Flynn, A. D. Drugging Membrane Protein Interactions. *Annu Rev Biomed Eng*. 2016;18:51–76.

Yoon, S. K., Song, J. Y., y Lee, G. M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82(3):289–298.

Young, J. C. The role of the cytosolic HSP70 chaperone system in diseases caused by misfolding and aberrant trafficking of ion channels. *Dis Model Mech*. 2014;7(3):319–329.

Zhang, Q., Zulfiqar, F., Riazuddin, S. A., Xiao, X., Ahmad, Z., Riazuddin, S., y Hejtmancik, J. F. Autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Pakistani family mapped to CNGA1 with identification of a novel mutation. *Mol Vis*. 2004;10:884–889.

Zhou, Z., Gong, Q., y January, C. T. Correction of Defective Protein Trafficking of a Mutant HERG Potassium Channel in Human Long QT Syndrome: PHARMACOLOGICAL AND TEMPERATURE EFFECTS. *J Biol Chem*. 1999;274(44):31123–31126.

Zuiderweg, E. R. P., Hightower, L. E., y Gestwicki, J. E. The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. *Cell Stress Chaperon*. 2017;22(2):173–189.

ANEXOS

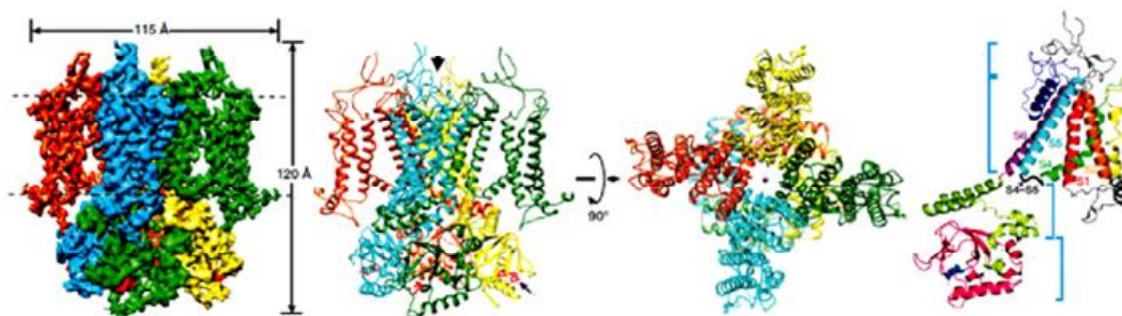


Figura A1. Arquitectura del canal CNG. A. Mapa de densidad electrónica de la estructura cristalizada del canal TAX-4, las líneas punteadas representan los límites de membrana plasmática y los ejes muestran el tamaño de la estructura. B. Vista sagital y axial del canal iónico. C. Vista paralela a la membrana de una subunidad mostrando cada uno de los segmentos transmembranales (S1-S6), la región del carboxilo terminal integrada por el C-linker y el CNBD, en el cual se observa unido el GMPc (Li y cols., 2017).

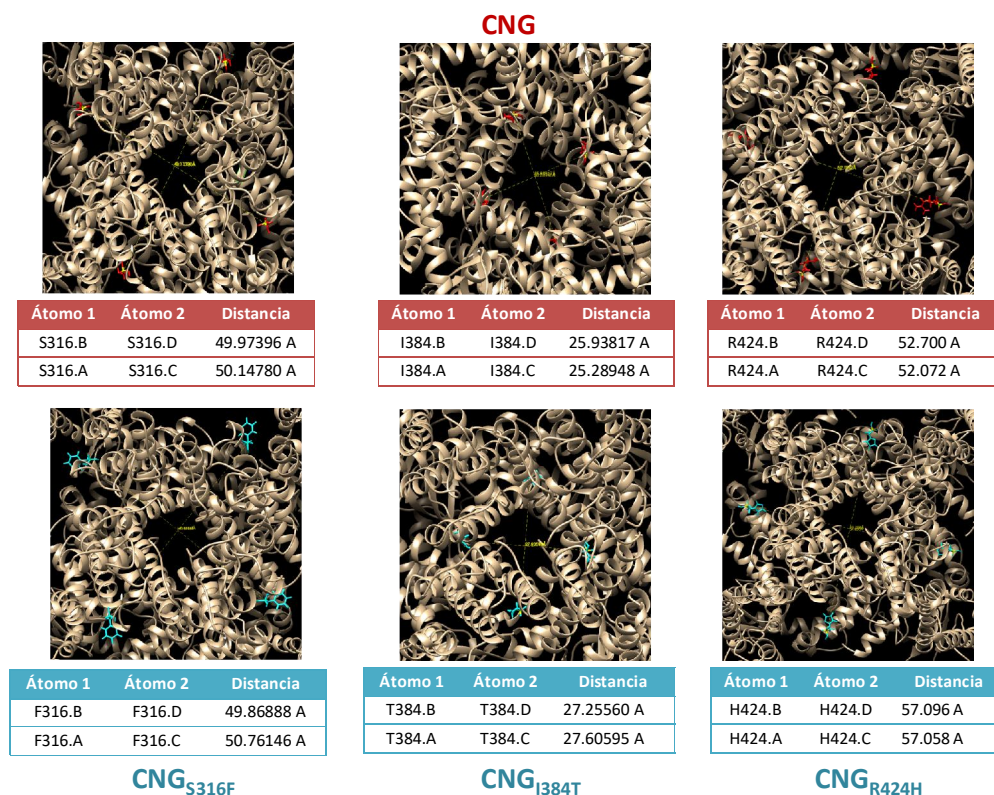


Figura A2. Distancias atómicas del diámetro de canales CNG. A partir del modelado de las subunidades hCNGA3 silvestre y mutantes se analizó la distancia entre residuos paralelos para determinar el diámetro de la estructura resultante. Análisis realizado usando el programa Chimera 1.11.2.

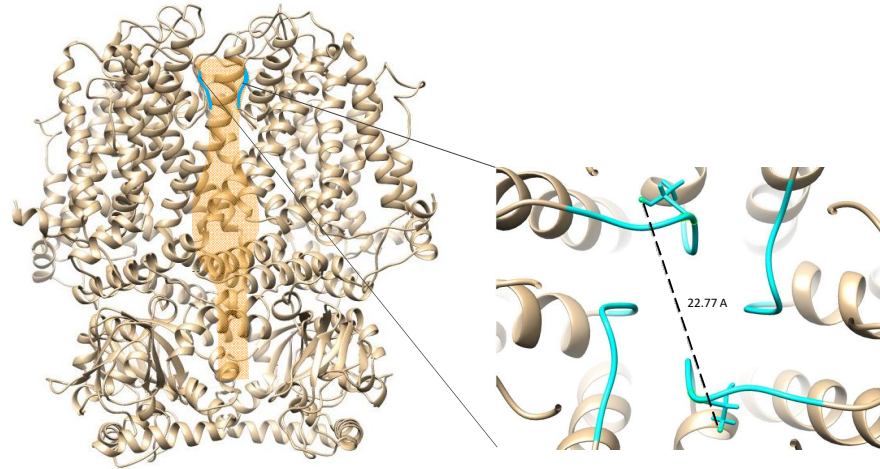


Figura A3. Diámetro del filtro de selectividad del canal CNG silvestre. Se midió la distancia entre dos aminoácidos (T364.B y T364.D) altamente conservados del filtro de selectividad del canal CNG silvestre y se compararon con las distancias de los canales CNG mutantes. La distancia obtenida para el canal CNG fue 22.77 Å, mientras que para las mutantes CNG_{S316F}, CNG_{I384T} y CNG_{R424H} fueron de 19.39, 21.83 y 21.62 Å respectivamente.