



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE
DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Localización de la mutante puntual E228K del canal CNG relacionada a canalopatías, expresada en células HEK-293”

TESIS

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

PRESENTA:

QBT. MARLENNE EDITH PERALES GARCÍA



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Localización de la mutante puntual E228K del canal CNG relacionada a canalopatías, expresada en células HEK-293”

TESIS

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

PRESENTA:

QBT. MARLENNE EDITH PERALES GARCÍA

APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Localización de la mutante puntual E228K del canal CNG relacionada a canalopatías, expresada en células HEK-293”

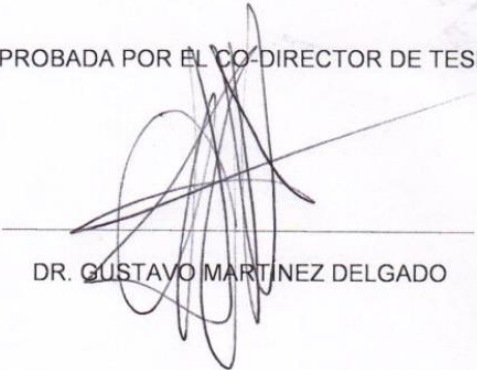
TESIS

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

PRESENTA:

QBT. MARLENNE EDITH PERALES GARCÍA

APROBADA POR EL CO-DIRECTOR DE TESIS



DR. GUSTAVO MARTÍNEZ DELGADO

Victoria de Durango, Durango

diciembre 2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Localización de la mutante puntual E228K del canal CNG relacionada a canalopatías, expresada en células HEK-293”

TESIS

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

PRESENTA:

QBT. MARLENNE EDITH PERALES GARCÍA

APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL

DRA. ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ
DIRECTOR DE TESIS

DR. GUSTAVO MARTINEZ DELGADO
CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIBEL CERVANTES FLORES
SECRETARIA

DRA. EDA GUADALUPE RAMÍREZ VALLES
VOCAL

Victoria de Durango, Durango

diciembre 2017

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED y en el laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares y Óseas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la Dra. Angélica María López Rodríguez y el Dr. Gustavo Martínez Delgado. Este proyecto fue posible gracias al apoyo económico de los proyectos UJED-PTC-096 y CÁTEDRAS CONACYT ID. 2252.

"Science is a beautiful gift to humanity; we should not distort it"

Abdul Kalam

DEDICATORIA

Mis papás Nena, Toño y mi hermana Daniela, representan mi empuje diario para continuar, el apoyo incondicional en todos los escenarios, GRACIAS por siempre apoyar mis sueños y brindarme su amor para poder enfrentar los retos que la vida me ha colocado en el camino, hoy sé que ningún logro tiene sentido si no tienes una familia con quién compartirlo y que no importa lo bien o mal que vayan las cosas siempre podré regresar a mí hogar por un abrazo de esos que reconfortan el alma.

Chuyin y Mónica, quiénes en medio de un monstruo de ciudad me dieron un hogar a donde regresar, creo que es una muestra muy grande de amor. Me consintieron y apoyaron y sobre todo mi tío me acompañó tantas veces a escuchar la misma exposición, esas pequeñas cosas son mis tesoros más valiosos, Mónica fuiste mi compañera y amiga y te ganaste un sitio especial en mi corazón.

Tío Rafa, Pity y Liz, porque, aunque no nos veamos tanto, sus muestras de cariño y apoyo incondicional me han rodeado a través de los años, de igual manera a Raquel, Miguel, Or, Andrea y mi pequeña Mi.

Mis abuelitos que aún tengo la fortuna de tener en vida Oti, Toño y Nina, que con un gesto de ternura alegran y dan sentido a mí existir.

Mi equipo GECCO hoy compartimos un sueño de vida: Giselle, te he aprendido tanto a tu corta edad gracias por enseñarme a no tener miedo a intentar nada, rodeada de las personas correctas todo puede ser posible, gracias a ti aprendí a creer en mí misma y en no perder la capacidad de soñar. Dr. Fernando gracias por no solo guiar mi carrera y darme jalones de orejas sino también creer en mí siempre y sobre todo por apoyar mis ganas de seguirme preparando y perseguir mis sueños. A ambos, no puedo sino agradecer su presencia tan valiosa en esta etapa tan importante y trascendental de mi vida.

Y especialmente, a Lía bebé, quién tiene mi corazón ganado para toda la vida.

Para todos ustedes, con todo mi cariño

Marly

AGRADECIMIENTO

Al programa de **posgrado en Biología Molecular y Celular**, por la oportunidad de prepararme y guiar mi camino en ciencia a través de sus enseñanzas académicas, agradezco de manera especial a la jefa de posgrado **Dra. Norma Urtíz Estrada** y al Secretario Académico el **Dr. Marcelo Barraza Salas** por su seguimiento oportuno desde el comienzo hasta el final del programa, asimismo agradezco a la **Dra. Eda Guadalupe Ramírez Valles** quién además de ser parte fundamental de la facultad también lo es de este proyecto como miembro de mi comité tutorial, gracias por su apoyo, retroalimentación y motivación. De igual manera a la **Dra. Maribel Cervantes Flores** cuyas observaciones como miembro de mi comité siempre fueron acertadas y enriquecedoras tanto para el proyecto como para mí.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento del proyecto y por la oportunidad de cursar una maestría dentro de los programas de calidad, también por hacerme acreedora a la Beca Mixta Semestre B 2016.

Al **Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)** Que me abrió las puertas de su laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares y de las Unidades de Microscopía Confocal y Secuenciación a través del **Dr. Gustavo Martínez**. No puedo dejar de agradecer al **Dr. Rafael Velázquez Cruz** por abrirme de par en par las puertas de su laboratorio desde el primer día y dar seguimiento a mi crecimiento profesional, asimismo a la **Dra. Valeria Quintanar** por su paciencia y enseñanzas en el microscopio confocal y a la **Dra. María Teresa Villarreal Molina** por acogerme en su laboratorio.

Al **Instituto de Neurobiología UNAM campus Juriquilla** gracias **Dr. Ataúlfo Martínez** y colaboradores por recibirme, especialmente **MC. Ángeles Edith Espino**, por enseñarme con paciencia, pero sobre todo por mostrarme que se puede ser alguien con una vasta experiencia y seguir conservando la humildad, me llevo muy buenos recuerdos de tu persona.

La vida me ha enseñado a agradecer por cada una de las personas que cruzan mi camino, a aprender lo más que pueda de sus experiencias y quedarme con las cosas buenas que aportan a mí historia, a mis **directores de tesis**, gracias por dejarme participar de este proyecto, me llevo sus enseñanzas académicas y profesionales y nuevas aptitudes para desarrollar en el futuro.

Mi gratitud entera para cada una de las personas que han estado a mi lado durante estos dos años, especialmente mis **amigas**, todas me apoyaron incondicionalmente y me dieron aliento en los momentos más difíciles, mi corazón siempre tendrá un lugar de suma importancia para todas ustedes. Solo me resta agradecer a **Dios** por mi presente y mi futuro.

ABREVIATURAS

AAT: Déficit de antitripsina alfa 1

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

Ca²⁺: Calcio, elemento químico

cAMP: Adenosín 3,5- monofosfato cíclico

cGMP: Guanosín 3,5-monofosfato cíclico

CNBD: (cyclic nucleotide binding domain) Sitio de unión a nucleótidos cíclicos

CNG: (Cyclic nucleotide-gated) canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos

DIN: Diabetes insípida nefrógena

DH5 α : Cepa de *E.coli*

DMEM: Medio completo suplementado con suero fetal bovino

ERG: Electrorretinograma

FQ: Fibrosis quística

GDP: Guanosín difosfato

GFP: (Green fluorescent protein) Proteína verde fluorescente

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

GTP: Guanosín trifosfato

HEK-293: Siglas en inglés para células embrionarias de riñón humano 293

hERG: (Human Ether-a-go-go-related Gene) canal de potasio humano

HF: Hipercolesterolemia familiar

K⁺: Potasio, elemento químico

Kan: Kanamicina

LB: Luria-Bertani medio para crecimiento de bacterias

MCV: Cuerpo multivesicular

Na⁺: Sodio, elemento químico

NaCl: Cloruro de Sodio

Nm: Nanómetros

OCA: Albinismo oculocutáneo

pAcGFP1-N2: Vector de expresión para células de mamífero fusionado a GFP

PFU: Polimerasa de ADN encontrada en la bacteria *Pyrococcus furiosus*

RE: Retículo endoplásmico

RP: Retinitis pigmentosa

SFB: Suero fetal bovino

SNARE: (Soluble NSF Attachment Receptor) receptores de proteínas de fijación soluble de NSF

S.O.C: Caldo superóptimo con represión por catabolito

TRP: Receptores de potencial transitorio

UPR: (Unfolded protein response) Respuesta a proteínas desplegadas

V: Voltaje

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1	Biosíntesis de proteínas.....	3
2.2	Los defectos de tráfico proteico están asociados a patologías	6
2.3	Los canales CNG	7
2.4	Estrategias terapéuticas para el rescate de proteínas con defectos de tráfico.	12
III.	JUSTIFICACIÓN	14
IV.	OBJETIVO GENERAL	14
V.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
VI.	METODOLOGÍA	15
6.1	Estrategia general.....	15
6.2	Obtención de Mutante E228K.....	16
6.2.1	Transformación de producto de PCR en bacterias	18
6.2.2	Extracción de ADNp QIAGEN® Plasmid mini	18
6.2.3	Evaluación cuantitativa y cualitativa de ADNp	18
6.2.4	Secuenciación	18
6.3	Cultivo Celular y Transfección	19
6.4	Microscopía de Fluorescencia	19
VII.	RESULTADOS	20
7.1	Evaluación de la eficiencia de transfección.....	21
VIII.	DISCUSIÓN	26
IX.	CONCLUSIÓN	28
X.	BIBLIOGRAFÍA	29
XI.	ANEXOS	32
	ANEXO 1. Mutagénesis de E228K (Quikchange mutagénesis site-directed)	32
	ANEXO 2. Protocolo de transformación de bacterias por choque térmico	33
	ANEXO 3. Extracción de ADN plasmídico E228K QIAGEN PLASMID MINI.....	33
	ANEXO 4. Transfección a células HEK-293	35
	ANEXO 5. Co-localización con FM-464 y ER-tracker.....	36
	ANEXO 6. Localización y formación de puentes de Hidrógeno de E228 en la estructura del Canal CNG	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tráfico de canales CNG a la membrana plasmática.....	5
Figura 2. Anatomía del ojo	7
Figura 3. Vía de fototransducción en los bastones	8
Figura 4. Estructura del canal CNG	9
Figura 5. Ubicación topológica de E228K en el canal CNG.....	12
Figura 6. Estrategia para evaluar la localización de la mutante puntual E228K del canal CNG expresada en un sistema heterólogo.....	12
Figura 7. Características del vector pAcGFP1-N2 con el canal CNG fusionado...17	
Figura 8. Resultados de secuenciación de sanger para la mutación E228K.....	20
Figura 9. Eficiencia de transfección pAcGFP1-N2.....	21
Figura 10. Integridad celular y expresión del canal CNG-GFP	22
Figura 11. Eficiencia de transfección de la proteína mutante E228K	23
Figura 12. Ensayos de co-localización de control positivo pAcGFP1-N2, canal silvestre CNG-GFP y mutante E228K	25

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de primers diseñados para realizar la mutagénesis sitio dirigida.....16

RESUMEN

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten un flujo bidireccional regulado de iones dentro y fuera de la célula. Además, estas proteínas permiten activar cascadas de señalización en respuesta a diferentes estímulos. En cuanto a los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG), juegan un papel clave en la cascada de fototransducción de la visión en vertebrados, mutaciones en estos canales han sido asociadas a trastornos de deterioro visual como la retinitis pigmentosa y la acromatopsia. Además, estas mutaciones pueden inducir un tráfico defectuoso de proteínas, un plegamiento inadecuado y la retención de estas en el retículo endoplasmático. En el presente trabajo, estudiamos la localización del canal CNG mutado como una primera aproximación para entender los mecanismos subyacentes a los defectos en el tráfico intracelular de los canales de CNG. Para caracterizar aún más la localización celular de estas proteínas, en un vector de expresión para células de mamífero se fusionó la secuencia del canal silvestre CNG a la proteína verde fluorescente (GFP) y mediante mutagénesis sitio dirigida utilizando el kit Quikchange® se permitió generar el canal mutante E228K-CNG para luego ser expresado en un sistema heterólogo consistente en células HEK-293. El análisis de la localización intracelular de las proteínas mutantes WT-CNG y E228K-CNG se realizó mediante microscopía de fluorescencia y posteriormete, se realizó una comparación entre ellas, la cual permitió determinar que el canal mutado E228K-CNG se retiene intracelularmente, mientras que el canal de tipo silvestre se expresa en la membrana plasmática. Indicando que los cambios sutiles en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas tienen un impacto sustancial en su localización celular.

Palabras clave: Canales iónicos, tráfico intracelular, mutagénesis

ABSTRACT

Ion channels are membrane proteins that allow a bidirectional regulated flow of ions inside and outside the cell. Moreover, these proteins allow to activate signaling cascades in response to different stimuli. With regard to cyclic nucleotide dependent ion channels (CNG), they play a key role in the phototransduction cascade of vision in vertebrates, and mutations in these channels have been associated to visual impairment disorders such as retinitis pigmentosa and achromatopsia. Furthermore, these mutations can induce defective protein trafficking, inadequate protein folding and protein retention in the endoplasmic reticulum. In the present work, we studied the localization of a mutated CNG ion channel as a first approach to understand the mechanisms underlying defects in intracellular trafficking of the CNG channels. To further characterize the cellular localization of these proteins, an expression vector for mammalian cells containing the CNG wild type channel sequence was fused to the green fluorescent protein (GFP) and by site-directed mutagenesis using the Quikchange® kit, allowed to generate an E228K-CNG ion channel mutant to subsequently expressed in a heterologous system consisting on HEK-293 cells. Analysis of the intracellular localization of the WT-CNG and E228K-CNG mutant proteins by fluorescence microscopy and further comparison between them, allowed to determine that the E228K-CNG mutated channel is retained intracellularly, whereas the wild type channel is expressed in the plasma membrane. Indicating that subtle changes in the amino acid sequence of these proteins have a substantial impact in their cellular localization.

Key words: Ion channels, intracellular trafficking, mutagenesis

I. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas que se encuentran en la membrana de las células y son el medio de comunicación con su entorno. Estructuralmente tienen un poro que de manera regulada se abre o se cierra simulando una compuerta que permite el paso de iones. Los iones son partículas con cargas positivas o negativas, que inducen el potencial eléctrico responsable de la comunicación intercelular. Siendo fundamentales en procesos como la contracción muscular, la transmisión del estímulo nervioso y otros procesos fisiológicos. Para el correcto funcionamiento de los cinco sentidos, es necesario el flujo de iones. Por lo tanto, cuando los canales iónicos fallan se producen alteraciones leves o graves del funcionamiento normal de un organismo, conocidas como canalopatías.

La acromatopsia puede ser clasificada como una canalopatía, dado que a fecha se han evidenciado diversas mutaciones en los genes que codifican a canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (canales CNG), en pacientes con deficiencias en la apreciación de colores. Los canales CNG son activados directamente por la unión de nucleótidos cíclicos como guanosín monofosfato cíclico (GMPc) o adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y poseen un papel fundamental en la visión, ya que son responsables de mediar la respuesta de las células fotorreceptoras que se encuentran en la retina, al permitir el paso de iones con carga positiva como el calcio y el sodio, iones capaces de interactuar con diversas proteínas importantes para la propagación del impulso nervioso.

Frecuentemente, las proteínas mutantes del canal CNG presentan defectos en el plegamiento de la proteína, que afectan su estructura, induciendo retención intracelular. En algunas ocasiones las proteínas mutantes, no pueden llegar a la membrana plasmática donde regularmente cumplirían su función o llegan muy pocas proteínas desfavoreciendo su función. Se ha demostrado que algunas de las proteínas mutantes retenidas intracelularmente, pueden ser funcionales al recuperar su localización; es por esto que diversos grupos de investigación alrededor del mundo se enfocan en la constante búsqueda de moléculas o fármacos que favorezcan el plegamiento correcto de las proteínas.

Actualmente, no existe fármaco para tratar la Acromatopsia. Por ser una enfermedad hereditaria, lamentablemente tampoco se puede hacer mucho para evitarla. Sin embargo, al haber evidenciado a las proteínas implicadas en este padecimiento, se puede analizar su implicación fisiológica en el desarrollo de las anomalías visuales.

En este trabajo se evidencio mediante microscopia de fluorescencia el defecto de tráfico del canal CNG mutante E228K expresado en cultivos de células HEK-293.

II. ANTECEDENTES

La membrana plasmática constituye la estructura limítrofe de los componentes integrales de la célula, además de ser la única estructura que relaciona a la célula con su entorno. Las proteínas que residen y funcionan en la membrana plasmática regulan la entrada extracelular y la salida de moléculas bioactivas activando cascadas de señalización en respuesta a diferentes estímulos, potenciando a la vez la interacción entre células.

La presencia y abundancia de proteínas en la célula está regulada por el tráfico vesicular incluyendo los procesos de exocitosis y endocitosis. El citoesqueleto es esencial para los mecanismos de tráfico intracelular porque las vesículas y los endosomas se mueven a través de los filamentos de actina y los microtúbulos. Los mecanismos para la selección y ubicación de proteínas en membrana plasmática son muy estrictos (Sabatini y cols., 1982; Blobel, 2000) por ejemplo, las moléculas que serán transportadas a la membrana plasmática son etiquetadas por otras proteínas o tienen un determinado patrón de aminoácidos que sirve de señalización (péptido señal ~5-30 aa). La cantidad de proteínas de superficie celular es menor comparada a la población de proteínas totales, reflejando el constante recambio de las proteínas de membrana plasmática regulado por los mecanismos de endocitosis esenciales para el reciclaje de proteínas (Peer, 2011).

2.1 Biosíntesis de proteínas

Cuando el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) llega al citosol, éste se asocia con los ribosomas para iniciar la traducción. Una vez que la señal para ser proteína transmembranal es detectada, por el complejo ARN/ribosoma/complejo-peptídico, el producto es reconocido por la maquinaria de translocación localizada en el lumen del retículo endoplásmico (RE) (Deutsh, 2002). Tan pronto como las proteínas de membrana son trasladadas fuera del RE, estas son embebidas en vesículas lipídicas donde el plegamiento de la proteína naciente es asistido por proteínas chaperonas.

Algunas proteínas chaperonas permanecen unidas a la proteína hasta que ésta alcanza el plegamiento correcto, otras se van perdiendo o asociando durante el proceso de maduración (Curran y cols., 2015).

En general, el tráfico a través de RE está altamente regulado, las proteínas contienen motivos que promueven la exportación y motivos que indican el mal plegamiento (Tzivoni y cols., 1988). Se ha propuesto que, las proteínas plegadas incorrectamente, podrían formar interacciones con otras proteínas en el RE y quedarse retenidas o la exposición de ciertos motivos podría favorecer su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma (Vembar y cols., 2008).

Una vez que las proteínas nacientes son plegadas correctamente en las vesículas de transporte, las chaperonas se disocian y el canal puede continuar su camino hacia el aparato de Golgi donde pasan por diferentes procesamientos postraduccionales como la glicosilación.

Las proteínas correctamente plegadas y procesadas en el aparato de Golgi podrán continuar hacia su destino final en membrana plasmática. La vida media en membrana plasmática de algunos canales iónicos (como por ejemplo el canal hERG) es de ~10 hr cuando se expresa en sistemas heterólogos (Ficker y cols., 2003; Kagan y cols., 2000; Li y cols., 1992). La degradación de esta proteína es ubiquitina-dependiente (Chapman y cols., 2005), pero la exposición de células a concentraciones bajas de potasio promueve la degradación por endocitosis mediada por la unión a calveolina, una proteína que induce invaginaciones en la membrana plasmática (Guo y cols., 2009).

Estudios de tráfico de proteínas, llevados a cabo en levaduras y células de mamífero, revelaron el mecanismo subyacente mediante el cual las proteínas de membrana correctamente plegadas se ensamblan en vesículas para favorecer la incorporación proteica a la superficie celular mediante la exocitosis regulada o la exocitosis constitutiva (Curran y Mohler, 2015). La ruta de exocitosis constitutiva es utilizada principalmente por las células para la incorporación de proteínas y lípidos en la membrana, garantizando la eliminación de componentes que no sean útiles o que estén dañados. En contraste, la ruta secretora regulada se utiliza como mecanismo de

comunicación por células especializadas como: células endócrinas, sensibles a insulina, neuronas, células arcinares del páncreas, mastocitos y otros tipos celulares (Curran y Mohler, 2015). La exocitosis regulada es producida en respuesta a estímulos que provocan la movilización, el acoplamiento y la fusión de vesículas que permanecen cerca de la región de la membrana donde se fusionan y comparten sus componentes. Ambos tipos de exocitosis usan una cascada de interacciones proteína-proteína para asegurar la entrega eficiente de las vesículas que viajan hacia la membrana (Figura 1).

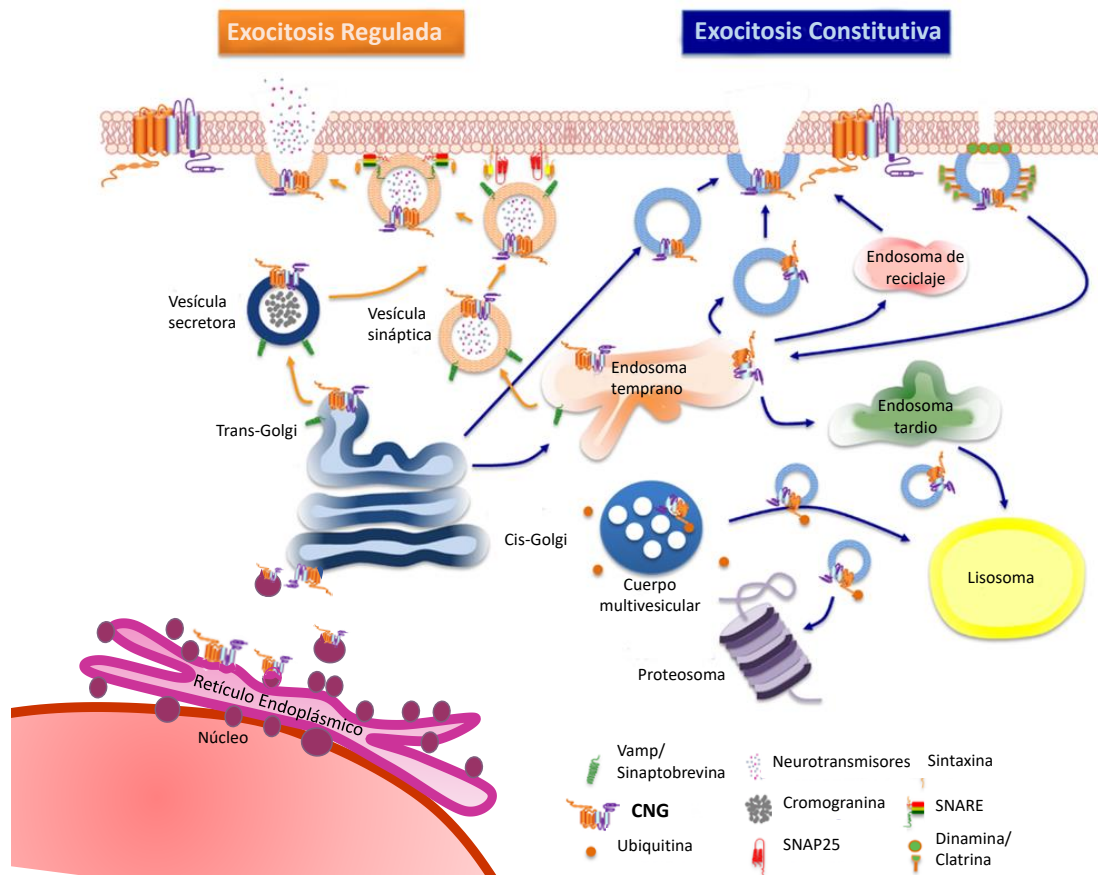


Figura 1. Tráfico de canales CNG a la membrana plasmática. El transcrito primario atraviesa el lumen de RE, la proteína es embebida en vesículas de transporte con ayuda de proteínas chaperonas. Si la proteína no está correctamente plegada, podría ser degradada en el proteosoma. Las proteínas correctamente plegadas continúan su transporte hacia el aparato de Golgi; donde ocurren modificaciones postraduccionales, posteriormente, las vesículas reguladoras (vesículas sinápticas o secretoras) podrían almacenar canales iónicos y/o favorecer su transporte hacia la membrana. Este tráfico es mediado por el complejo SNARE + Calcio. En la vía constitutiva los canales alcanzan la membrana plasmática por una exocitosis constante directamente desde Trans-Golgi o a través de endosomas tempranos. Los niveles de canales iónicos en membrana pueden ser también regulados a través de la vía clásica de endocitosis

dependiente de clatrina. Las proteínas endocitadas pueden ser fusionadas a endosomas tardíos y lisosomas o ser recicladas a la superficie celular. Los canales iónicos destinados a la degradación podrían ser retenidos en el cuerpo multivesicular (MCV) para ser enviados al lisosoma o bien ser ubiquitinados y degradados en el proteosoma. (Figura modificada de Curran y cols., 2015).

El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi han desarrollado fuertes mecanismos para regular la calidad de las proteínas. Múltiples procesos aseguran que los polipéptidos correctamente plegados sean entregados a la membrana plasmática, mientras que las proteínas plegadas de manera incorrecta se degradan. En general, los mecanismos de control de calidad evitan que las proteínas disfuncionales lleguen a su destino final, sin embargo, bajo condiciones extraordinarias estas proteínas pueden acumularse en RE.

La acumulación de proteínas incorrectamente plegadas en RE genera dos diferentes fenotipos:

- a) Pérdida de la función por deficiencia en la cantidad de proteína que alcanza la membrana plasmática.
- b) Estrés en RE debido a la acumulación de la proteína retenida.

2.2 Los defectos de tráfico proteico están asociados a patologías

Diversas patologías como fibrosis quística (FQ), diabetes insípida nefrógica (DIN), albinismo oculocutáneo (OCA), obesidad grave de inicio temprano, retinitis pigmentosa (RP), hipoplasia de células de Leydig, hipercolesterolemia familiar (HF) y déficit de antitripsina alfa 1 (AAT) entre otras enfermedades (Botelho y cols., 2015) están asociadas a un incorrecto plegamiento de proteínas que, en consecuencia, provoca defectos en el tráfico celular. En algunas de estas enfermedades la proteína incorrectamente plegada es potencialmente funcional pero su función se ve impedida ya que no puede alcanzar su destino en membrana plasmática y es denominada proteína mutante.

De manera particular, los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos o canales CNG (Cyclic Nucleotide Gated channel) están relacionados a retinopatías y

además representan un buen ejemplo de proteínas de membrana que inducen retención intracelular cuando la proteína está mutada (Kaupp y Seifert, 2002).

2.3 Los canales CNG

Inicialmente los canales CNG fueron descubiertos en las células fotorreceptoras llamadas conos y bastones en retina del ojo (Figura 2); estas células transmiten señales visuales desde el ojo hasta el cerebro a través de un proceso llamado fototransducción. Los bastones favorecen la visión en condiciones de poca luz, mientras los conos proporcionan la visión en condiciones de luz brillante (Haynes y Yau, 1985). Los bastones representan el 95% del total de las células fotorreceptoras y son los responsables de detectar la intensidad de la luz mientras que los conos representan el 5% restante y son los responsables de la definición del color (Haynes y Yau, 1985).

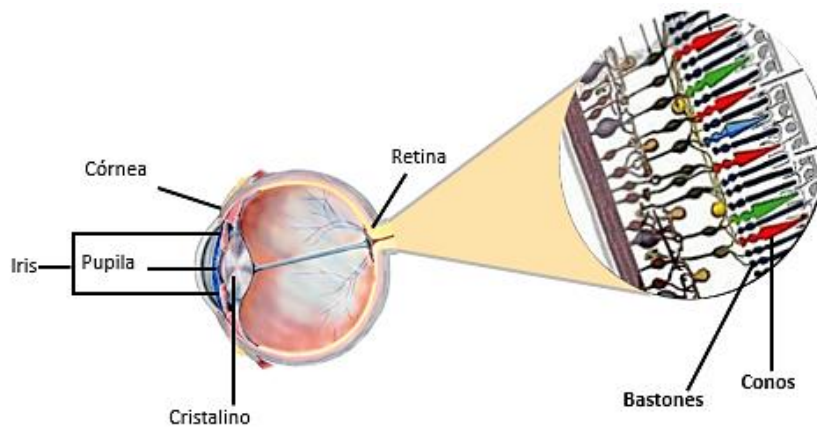


Figura 2. Anatomía del ojo. La córnea y el cristalino son los dos elementos transparentes del ojo, se encargan de dejar pasar la luz hacia la capa interna: La retina, que se encuentra en la parte posterior del ojo. La retina es una estructura compleja formada por diversos tipos de células interconectadas, donde las únicas células que procesan la luz son las células fotorreceptoras, llamadas bastones y conos.

El papel funcional de los canales CNG en las cascadas de transducción sensorial ha sido descrito como un reflejo del efecto inducido por diversas mutaciones relacionadas a numerosas patologías. Los canales CNG se abren en presencia de nucleótidos cíclicos: cGMP (guanosín 3,5-monofosfato cíclico) o cAMP (adenosín 3,5-monofosfato cíclico). La concentración intracelular de nucleótidos cíclicos cambia en función de los

estímulos visuales u olfativos. En la cascada de transmisión de señales para la visión, la absorción de la luz por los fotorreceptores disminuye la concentración de cGMP conduciendo al cerrado del canal, debido a una hiperpolarización celular; sin embargo, en la oscuridad los niveles de cGMP aumentan. La unión de cGMP a los canales CNG favorece su activación o apertura, permitiendo el flujo de cationes (Na^+ y Ca^{2+}) hacia el interior de la célula induciendo la despolarización de la misma (Figura 3). En el caso de la cascada de transmisión de señales olfativas, las moléculas odorantes producen un incremento de cAMP, permitiendo la apertura de los canales CNG, conduciendo a la despolarización de las neuronas olfativas y generando eventualmente un potencial de acción (Craven y Zagotta; 2006).

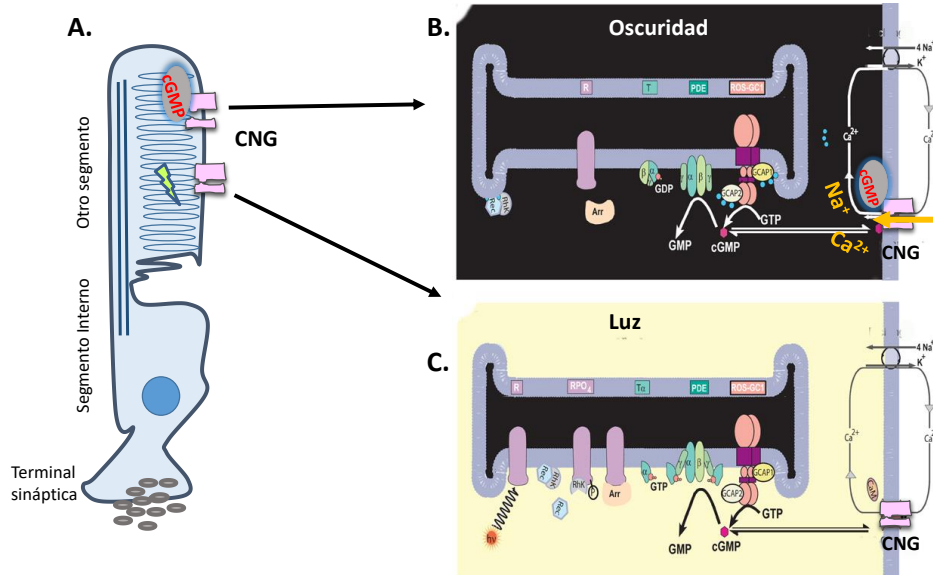


Figura 3. Vía de fototransducción en los bastones. **A.** Imagen representativa de un bastón mostrando sus partes y la localización de los canales CNG. **B.** En condiciones de oscuridad, la unión a cGMP induce la apertura de los canales CNG permitiendo el paso de cationes hacia el interior de la célula. El movimiento de iones está también regulado por la actividad del intercambiador Na^+/K^+ , Ca^{2+} . **C.** En condiciones de luz, la disminución de la concentración citoplasmática de cGMP libre inhibe la apertura de los canales CNG disminuyendo la afluencia de cationes en el segmento exterior.

Los canales CNG pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje, donde se incluyen los canales de potasio (Kv), sodio (Nav), calcio (Cav) y los canales receptores de potencial transitorio (TRP). Aunque la dependencia de voltaje de los canales CNG no está claramente definida (Paoletti, y cols., 1999).

Topológicamente son tetrámeros, cada subunidad está formada por seis segmentos transmembranales (S1- S6), S1-S4 integran la región del sensor de voltaje, siendo el segmento S4 positivamente cargado. Los segmentos S5 y S6 forman un poro para la entrada de iones. Las regiones amino (N) y Carboxilo (C) terminal son citosólicas. El sitio de unión al ligando (CNBD) se localiza en el carboxilo terminal. En los mamíferos la familia de canales CNG se compone de 6 miembros homólogos que se clasifican como subunidades alfa (CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4) y subunidades beta (CNGB1 y CNGB3; CNGB2 no existe). Las subunidades alfa y beta comparten la misma topología, aunque la subunidad beta es más grande, cada subunidad representa un sitio de unión para los nucleótidos cíclicos (Figura 4). El sitio de unión a nucleótidos cíclicos está compuesto por cerca de 120 aminoácidos conservados en los canales de retina y olfatorios.

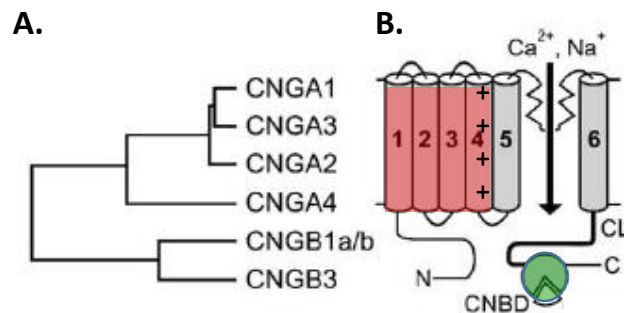


Figura 4. Estructura del canal CNG. **A.** Árbol filogenético de la familia de canales iónicos CNG humanos, **B.** Topología del canal CNG, mostrando en rojo la región del sensor de voltaje (S1-S4), en gris los segmentos transmembranales formando el poro (S5-S6) y en verde el sitio de unión a nucleótidos.

Los canales CNG fisiológicamente son heterómeros integrados por subunidades alfa y beta (Zheng y cols., 2002). Los canales CNG no son selectivos, permean Na^+ y una variedad de cationes monovalentes, sin embargo, la permeabilidad a Ca^{2+} es mayor. La presencia de las subunidades beta favorece la permeación de los iones Ca^{2+} . La composición precisa de las subunidades formando un canal es lo que determina su papel fisiológico, la afinidad nucleotídica, la selectividad iónica y su modulación por Ca^{2+} (Noha y cols., 2011).

Diversos estudios han demostrado que la expresión homomérica de canales CNG integrados por la subunidad alfa (CNGA1), mantiene las propiedades biofísicas funcionales nativas cuando se expresa en sistemas heterólogos como células HEK-293 y ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Holmgren, 2003; Contreras y cols., 2006, 2008 y 2010; Lopez-Rodriguez y Holmgren, 2012).

Más de 100 mutaciones relacionadas a los genes que codifican a la subunidad CNGA3 y 50 mutaciones para la subunidad CNGB3 han sido reportadas en personas con acromatopsia; un raro trastorno autosómico recesivo caracterizado por la ausencia de función cónica que causa una mala agudeza visual, fotofobia severa y pérdida o alteración en la visión del color, presenta una incidencia de 1 en 30,000 manifestándose poco después del nacimiento o a temprana edad (Zobor, 2017).

Los resultados fisiopatológicos indican que existen dos tipos de acromatopsia, completa e incompleta. Los pacientes que presentan acromatopsia completa tienen una pérdida total de la función de los conos y su agudeza visual es menor a 0.1. En el caso de los pacientes que presentan acromatopsia incompleta, hay una pérdida parcial de la función de uno o varios conos lo que les proporciona un poco de agudeza visual y aunque baja, poseen la capacidad de visualizar algunos colores (Ueno, 2017).

La acromatopsia pertenece a un conjunto de desórdenes de la retina de origen hereditario denominados "distrofias de retina". El 75% de las mutaciones que se encuentran causando acromatopsia han sido atribuidas a los canales CNG (Zobor, 2017). La forma más frecuente de distrofias de retina representando de 85 al 90% de los casos es la retinitis pigmentosa afectando a 1 en 4,000 individuos, resultando más de 1 millón de personas afectadas mundialmente. Más de 100 mutaciones del gen que codifica la subunidad CNGA3 han sido asociadas a retinitis pigmentosa (RP) constituyendo cerca del 1% de las mutaciones asociadas a esta enfermedad (Arno, 2017). RP causa una pérdida lenta de la visión, comenzando por una disminución de la visión nocturna aunada a la pérdida de la visión periférica (lateral). La enfermedad puede degenerar en ceguera cuando el paciente alcanza una edad mediana (Schön y cols., 2013).

Aún no se ha esclarecido por completo el mecanismo de disfunción y muerte de las células fotorreceptoras, como respuesta a mutaciones en los canales CNG. La mayoría de las mutaciones reportadas en estos canales iónicos provoca deleciones o importantes cambios estructurales que en su mayoría inducen defectos en el tráfico de proteínas (Schön y cols., 2013).

Defectos en el plegamiento y ensamble de las proteínas representan la mayoría de los defectos asociados al tráfico intracelular. La retención de proteínas en el RE representa un factor importante en la patogénesis de múltiples enfermedades humanas (Duricka, 2012). Además, la acumulación de proteínas en RE puede llegar a causar estrés reticular y desencadenar la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), un mecanismo celular conservado evolutivamente que resulta ya sea en una mayor capacidad del procesamiento de proteínas, o bien, en muerte celular. Mutaciones que inducen un tráfico defectuoso conducen a una pérdida de la función de los canales CNG, favoreciendo la retención intracelular (Schroder, 2004).

En el año 2008 pacientes diagnosticados con acromatopsia, fueron colectados por el laboratorio de genética molecular del instituto de investigación oftálmica en Tuebingen, evidenciando un grupo de mutaciones del canal CNG cuyos defectos fisiológicos son atribuidos a la retención intracelular de las proteínas mutantes (Reuter y cols., 2008). Para diagnosticar a los pacientes se hizo examinación oftalmológica incluyendo Electrorretinograma (ERG), examen de fondo, agudeza visual, pruebas de campo visual y análisis de color estándar. Se incluyeron 100 controles y 21 pacientes con diagnóstico de acromatopsia completa e incompleta y distrofia de conos. Se encontraron 5 pacientes homocigotos y 16 heterocigotos para mutaciones en CNGA3. En 18 de los pacientes se encontraron 3 variantes conocidas y en 3 pacientes, 3 variantes nuevas, una de las variantes encontradas es la sustitución del glutamato por lisina en el aminoácido 228 (E228K) (Reuter y cols., 2008).

La mutación E228K induce el cambio de un aminoácido negativo (glutamato) por un aminoácido positivo (lisina). Los pacientes portadores de esta variante presentan baja agudeza visual y una función reducida de los conos es decir (acromatopsia

incompleta). Topológicamente E228K se sitúa en el asa intracelular que conecta el S2 y S3 de la región del sensor de voltaje, afectando una posición evolutivamente conservada en humanos, bovinos, pollos y murinos (Figura 5).

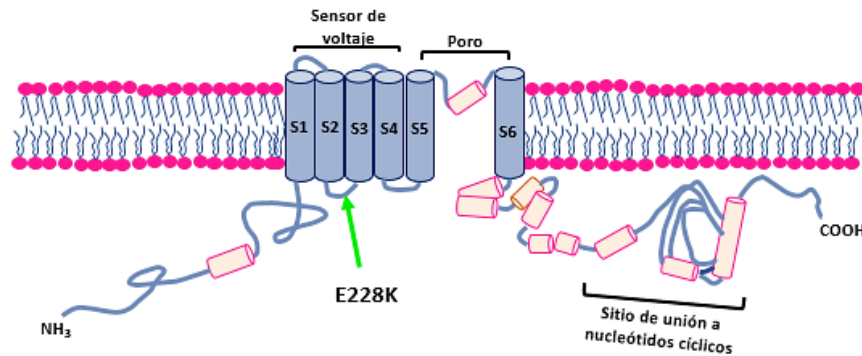


Figura 5. Ubicación topológica de E228K en el canal CNG. La mutación E228K correspondiente a la sustitución de un ácido glutámico por una lisina se ubica en el asa intracelular que une al S2 con S3 en la región del sensor de voltaje.

2.4 Estrategias terapéuticas para el rescate de proteínas con defectos de tráfico.

Diversos estudios coinciden en que las mutaciones en los genes que codifican para canales iónicos e inducen defectos en el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática son la causa más común de las canalopatías (Patologías relacionadas a desórdenes que alteran las propiedades biofísicas, tales como: gating o apertura y cierre de los canales iónicos etc).

Es por esto que se han implementado posibles estrategias terapéuticas que tienen como objetivo rescatar la conformación de la proteína nativa o inducir la estabilización del mal plegamiento de las proteínas. Para ello, se han empleado pequeñas moléculas denominadas chaperonas (Leandro, 2008). Algunas de las proteínas mutantes del canal CNG han sido rescatadas utilizando métodos térmicos (Reuter y cols., 2008) o químicos (López-Rodríguez y Holmgren, 2012; Duricka y cols., 2012) y su función ha sido analizada mediante métodos electrofisiológicos; sugiriendo que algunas de las

proteínas mutantes retenidas intracelularmente son funcionales, aunque la señal de localización en membrana plasmática podría estar afectada debido a un plegamiento inadecuado o a alteraciones en el ensamblaje del canal.

Además, el reciente establecimiento de varios modelos animales para el estudio de retinopatías, aunado al uso de vectores virus adeno-asociados para administración de genes en los fotorreceptores de la retina representa una esperanza para el desarrollo de una terapia génica (Michalakis, 2017). Sin embargo, aún no existe una estrategia que facilite el re-establecimiento de la localización y función de las proteínas mutantes del canal CNG asociadas a canalopatías.

III. JUSTIFICACIÓN

El tráfico defectuoso de proteínas ha surgido como consecuencia de las mutaciones genéticas, cambios sutiles en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas genera un impacto en su localización celular, como resultado de un incorrecto plegamiento o deterioro molecular.

Determinar la localización intracelular de proteínas mutantes, como E228K del canal CNG, favorece el entendimiento sobre el impacto estructural y funcional que inducen las mutaciones sobre la fisiología celular, facilitando a la vez el desarrollo de fármacos que modulen localización y la función de la proteína afectada.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización intracelular de la mutante E228K del canal CNG, usando como modelo de expresión las células HEK-293.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar la mutación E228K en un vector de expresión para células de mamífero que permite la expresión del canal CNG fusionado a la proteína verde fluorescente (CNG-GFP).
2. Expresar el canal mutante CNG-GFP en células HEK-293 para determinar su localización celular mediante microscopía de fluorescencia.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Estrategia general

Tipo: Estudio descriptivo

Lugar: Este trabajo se desarrolló en la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED, en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), así como en el Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla.

Período: agosto 2015 a junio 2017.

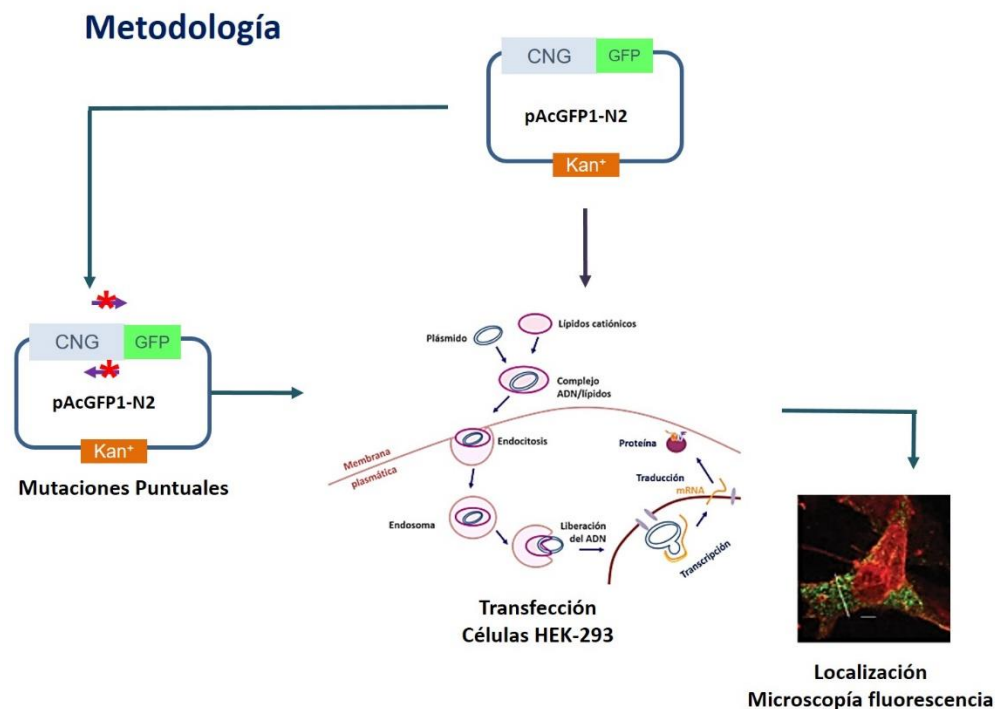


Figura 6. Estrategia para evaluar la localización de la mutante puntual E228K del canal CNG expresada en un sistema heterólogo. Inducir la mutante E228K en el vector pAcGFP1-N2 expresando la fusión CNG-GFP mediante el estuche QuikChange. Posteriormente, transfectar la mutante generada en células HEK-293. Analizar la localización de la proteína mediante microscopía de fluorescencia 24 a 48 h después de la transfección y comparar la localización de la proteína mutante contra la localización de la proteína silvestre.

6.2 Obtención de Mutante E228K

Usando como modelo de estudio el homólogo bovino CNGA1 (bCNGA1, GeneBank accession number NM_174278) por ser esta proteína ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Se comenzó por diseñar los primers utilizando The QuickChange® primer design tomando en cuenta los siguientes parámetros: fuerza de apareamiento (ΔG), temperatura media de fusión y formación de estructuras secundarias (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de primers diseñados para realizar la mutagénesis sitio dirigida

ID	Secuencia	Tm	GC%	Descripción
CNG03	CTATGAGTTTACGCTTTCCTTCACCAG TAGTCCTTGT	74.0	42.1	Antisentido E228K, equivalente a E231K en bCNGA1 (NM_174278)
CNG04	ACAAGGACTACTGGTGAAGGAAAAGCG TAAACTCATAG	74.0	42.1	Sentido E228K_ equivalente a E231K en bCNGA1 (NM_174278)

- Estos primers fueron diseñados sobre la secuencia codificante para el canal CNG. Los primers son complementarios entre sí y contienen en el medio de su secuencia (azul) el cambio de codón inducido. -

Posteriormente, se diseñó la mutante puntual: E228K siguiendo las instrucciones del estuche QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies). Utilizando como ADN blanco el vector para expresión en células de mamíferos: pAcGFP1-N2, al cual previamente se le ha insertado la secuencia de bCNGA1 en los sitios *Hind* III y *Eco* RI permitiendo la expresión de la fusión CNG-GFP (Figura 7).

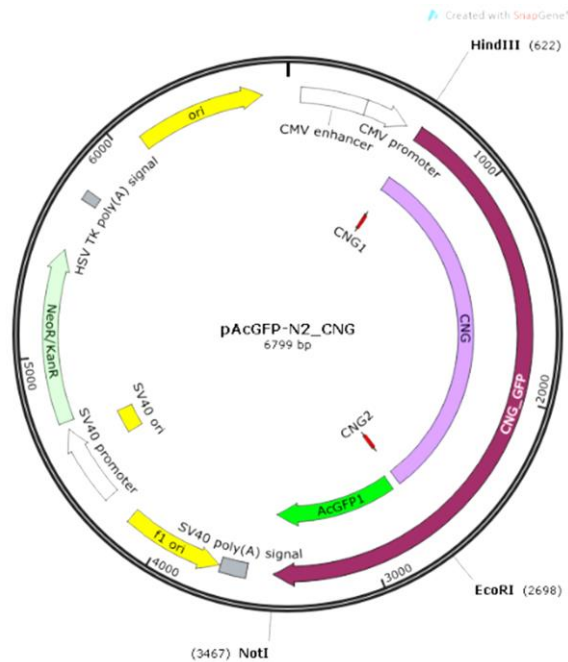


Figura 7. Características del vector pAcGFP1-N2 con el canal CNG fusionado. El marco abierto de lectura del canal CNG fue clonado usando un primer 3' en el cual el codón de paro fue removido permitiendo que la secuencia codificante del canal se mantenga favoreciendo la fusión con el marco abierto de lectura de la proteína verde fluorescente. La línea sólida color vino representa los aminoácidos codificados por la fusión CNG-GFP mientras la línea verde señala la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente.

Se realizó una PCR utilizando el par de primers correspondiente a la mutante y se amplificó el vector completo utilizando una enzima de alta fidelidad (PFU polimerasa) incluida en el estuche Quickchange® (Anexo 1). Posteriormente, se realizó una digestión del producto de PCR con la enzima *Dpn* I metilasa durante 1h a 37°C. La metilasa corta los sitios metilados provenientes del ADN blanco y deja únicamente las copias mutagénicas del producto de PCR. Se corrió un gel de agarosa 0.8% teñido con el marcador comercial SYBR® Safe DNA Gel Stain 30 min a 80v para corroborar la presencia de la mutación dentro de la secuencia original.

6.2.1 Transformación de producto de PCR en bacterias

Se transformó el producto de PCR digerido en bacterias, para ello se utilizaron DH5 α supercompetentes debido a que se observó que las bacterias provistas por el estuche Quickchange[®] no mostraron los resultados esperados (lento o nulo crecimiento) y se siguió el protocolo de choque térmico (Anexo 2).

6.2.2 Extracción de ADNp QIAGEN[®] Plasmid mini

Partiendo de un cultivo de bacterias DH5 α supercompetentes expresando el plásmido pACGFP1-N2-CNG, se levantó una colonia aislada y se inoculó en un tubo con 3 mL de medio LB, se incubó durante 16-18h en agitación 200 rpm a 37°C y se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial (Anexo 3).

6.2.3 Evaluación cuantitativa y cualitativa de ADNp

La evaluación cuantitativa del ADN plasmídico se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm para ello se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop2000 de la marca Thermo-Scientific[®] utilizando 1 μ L de la muestra. La evaluación cualitativa se realizó por electroforesis, para lo cual se preparó un gel de agarosa 0.8% teñido con el marcador comercial SYBR[®] Safe DNA Gel Stain, a 80v durante 35 min. Finalmente se observó utilizando un fotodocumentador ChemiDoc[™] MP de la marca Biorad[®].

6.2.4 Secuenciación

La mutación inducida fue corroborada por secuenciación de sanger, la muestra fue enviada a la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica, el resultado fue visualizado utilizando el software Snapgene de Biotech[®].

6.3 Cultivo Celular y Transfección

Las células HEK-293 fueron mantenidas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco) suplementado con 10% FBS (fetal bovine serum; Gemini Bioproducts), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 mg/mL, Gibco) incubando 37°C con atmósfera de CO₂ al 5%. La transfección se realizó en placas P35 preparadas agregando previamente 1 mL de Poly-L lisina. Posteriormente se cultivaron aprox 150,000 células durante 16-18h, incubando en las condiciones de mantenimiento, hasta obtener una confluencia de ~50%. Después se realizaron las transfecciones utilizando una mezcla de lipofectamineTM 2000, medio OptiMEM (Reduced Serum Medium, Invitrogen[®]) y ADN a distintas concentraciones (Anexo 4). Finalmente se evaluó la eficiencia de transfección utilizando microscopía de fluorescencia.

6.4 Microscopía de Fluorescencia

La eficiencia de las transfecciones fue analizada utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 analizando la expresión de la fusión CNG-GFP al exponer los cultivos celulares con un haz de luz a 475 nm emisión 505 nm de excitación, utilizando el objetivo de 40x. Realizando un análisis preliminar de la estabilidad del cultivo celular y de la expresión de la proteína CNG-GFP 24h después de la transfección. Particularmente la expresión de la proteína mutante requirió 48-72h de incubación después de la transfección. Posteriormente, se comenzó con los ensayos de co-localización. Para ello se utilizaron compuestos fluorescentes marcadores de organelos específicos siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial (Anexo 5), los compuestos utilizados fueron: FM 464 para membrana plasmática y ER-tracker para retículo endoplásmico. Posteriormente, las células fueron lavadas y observadas directamente al microscopio de fluorescencia a longitudes de onda 475/505 nm y 515/640 nm para verde y rojo respectivamente comparándose la localización de la mutante con respecto a la proteína silvestre CNG-GFP.

VII. RESULTADOS

La nula o reducida localización de canales CNG ubicados en la membrana plasmática debido a defectos en el tráfico intracelular, contribuyen al déficit funcional de proteínas con mutaciones, tal es el caso de la mutante E228K.

Utilizando el vector de expresión para células de mamíferos pAcGFP1-N2 que contiene en su secuencia el marco abierto de lectura del homólogo bovino CNGA1 (bCNGA1, GeneBank accession number NM_174278) y de la proteína verde fluorescente, se indujo la mutación E228K utilizando las instrucciones del estuche QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies). Se comprobó la presencia de esta mutación mediante secuenciación de Sanger. La Figura 8 muestra el electroferograma correspondiente al cambio nucleotídico G>A en la posición 231 del marco abierto de lectura del canal bCNGA1 correspondiente a la posición 228 del hCNGA1, que induce el cambio aminoacídico de un ácido glutámico por una lisina.

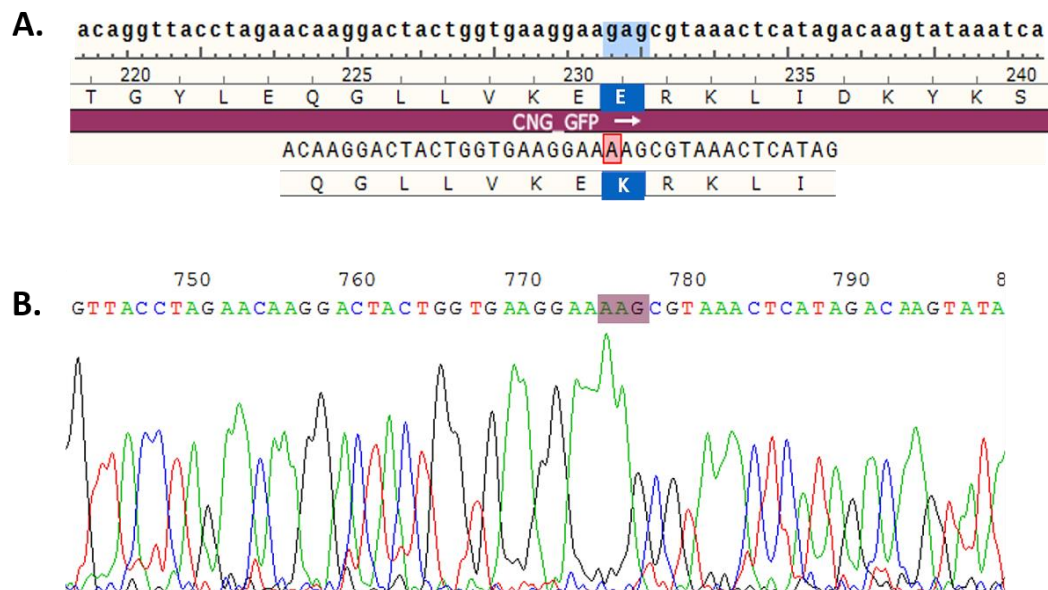


Figura 8. Resultados de secuenciación de Sanger para E228K. **A.** La imagen superior, nos permite observar la secuencia nucleotídica y aminoacídica del canal CNG-GFP, el cuadro azul sobre la secuencia nucleotídica resalta el codón gag en la posición 231 que codifica para Ácido glutámico y el cuadro rojo en la parte inferior nos indica el cambio inducido para la mutación a Lisina. **B.** La imagen inferior, muestra el electroferograma donde se comprueba la presencia de la mutación a lisina (cuadro morado).

7.1 Evaluación de la eficiencia de transfección

Una vez inducida la mutación se procedió a realizar los ensayos de la expresión de las proteínas silvestre (CNG-GFP) y mutante (CNG_E228K-GFP) en células HEK-293.

Para determinar la expresión proteica, 24 h posteriores a la transfección se procedió a observar las células en campo claro, luego se incidió un haz de luz de 475/505 nm. Como control positivo se utilizaron células transfectadas con 1 μ g del vector pAcGFP1-N2. La figura 9 muestra los resultados de la evaluación de la transfección. Se puede observar fluorescencia a lo largo de todo el citoplasma de la célula y una eficiencia de transfección de aproximadamente 80%. (Figura 9).

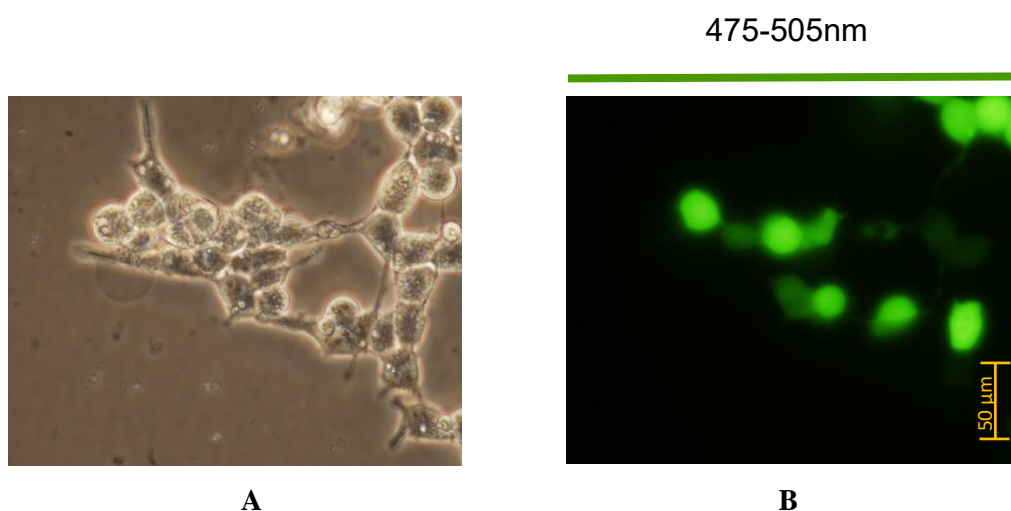


Figura 9. Eficiencia de transfección de pAcGFP1-N2. **A.** Células HEK-293 transfectadas con 1 μ g de pAcGFP1-N2, observadas en campo claro. **B.** Células transfectadas expresando la proteína verde fluorescente.

Posteriormente, se realizó la transfección del canal CNG-GFP silvestre usando 1 μ g de ADNp, El cultivo celular transfectado fue analizado a las 24 h. En la figura 10 se aprecia la integridad celular y la expresión de canal CNG en la membrana plasmática, además se observan algunos cúmulos en el citoplasma, que podrían corresponder a los canales que aún se encuentran en su tráfico hacia la membrana plasmática. Se puede observar una eficiencia de transfección mayor al 80%.

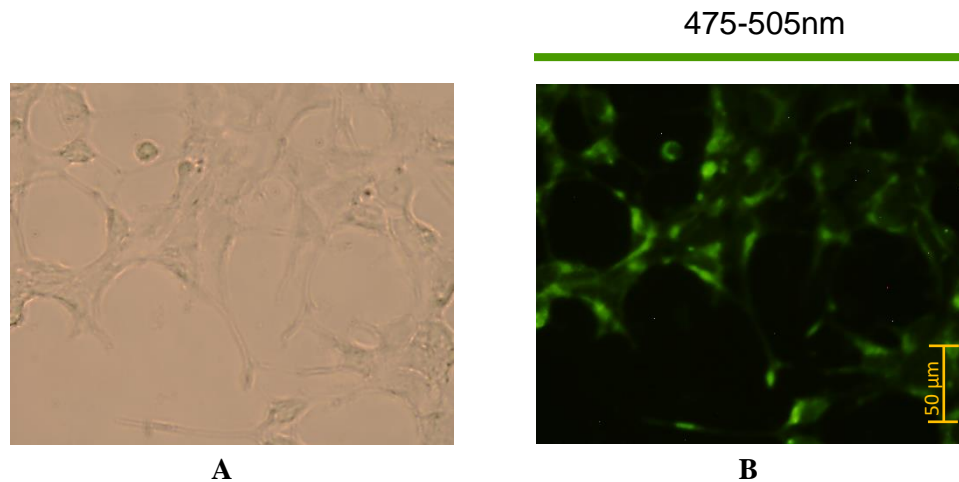


Figura 10. Integridad celular y expresión del canal CNG-GFP. **A.** Células HEK-293 transfectadas con 1 µg de CNG-GFP, observadas en campo claro. **B.** Células transfectadas expresando el canal silvestre CNG-GFP en la membrana plasmática.

La eficiencia de transfección de la proteína mutante E228K al utilizar 1 µg de ADN no fue exitosa, por lo que se utilizaron 1.5 µg de ADNp. Al evaluar la expresión de la proteína a las 24 h no se observó señal de la proteína CNG-GFP, por lo que se decidió esperar hasta las 48 h posteriores a la transfección. En la figura 11 se observa la expresión de puntos localizados indicando la expresión proteica en una región que según la imagen de campo claro podría corresponder al citoplasma de la célula, no a la membrana plasmática. Se puede observar una mínima eficiencia de transfección, comparado a la mostrada por el canal silvestre y al control positivo.

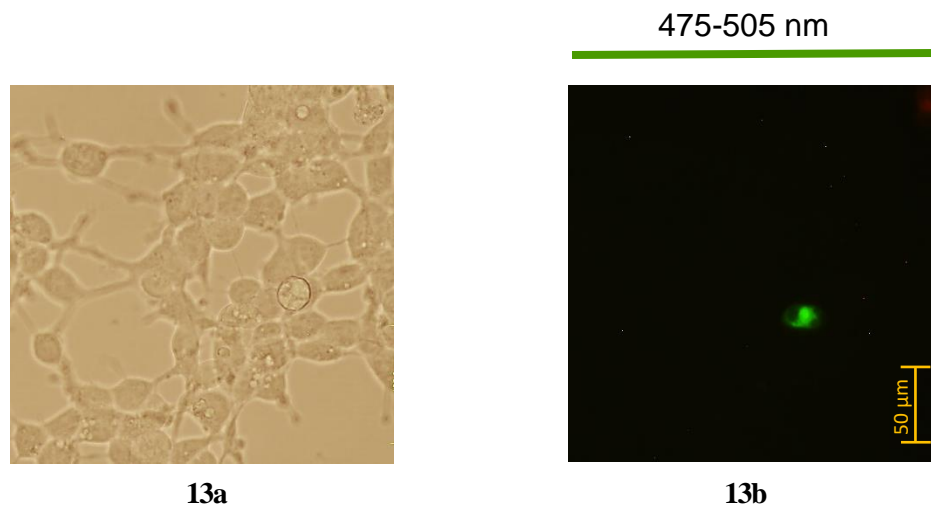


Figura 11. Eficiencia de transfección de la proteína mutante E228K. **A.** Células HEK-293 transfectadas con 1.5 µg de la mutante E228K, observadas en campo claro **B.** Células transfectadas expresando la mutante E228K en el interior de la célula.

Una vez que se verificó la eficiencia de la transfección, se procedió a realizar los ensayos de co-localización, utilizando un compuesto fluorescente que se expresa en retículo endoplásmico (ER-tracker), se añadió a las células 100 µL [1 mM] previamente temperado y se llevaron a incubar durante 30 min a 37°C 5% CO₂. Se observaron al microscopio a una longitud de onda de 515/640 nm.

Posteriormente, se realizó el ensayo con el compuesto marcador de membrana plasmática, para ello se colocaron las células al microscopio, se eligió cuidadosamente el campo de interés y se agregaron 60 µL [5 µg/mL] del compuesto, manteniendo la placa en la platina del microscopio, se dejó actuar durante 1 minuto y se tomó inmediatamente la foto, debido a que se observó que transcurridos 3 minutos el compuesto se encontraba difundido completamente a través de la célula.

La Figura 12 muestra los resultados de los ensayos de co-localización. En el caso del Control positivo, se observan las células transfectadas con GFP disperso a lo largo del citoplasma de la célula, el marcador de membrana se visualiza claramente en la marcando la periferia de la célula y en el caso de retículo endoplásmico, se visualiza marcado con cúmulos de puntos.

El canal silvestre CNG-GFP se detectó de manera clara en la membrana plasmática, con una eficiencia de transfección >80%, de manera similar a la imagen donde se detectó la membrana plasmática usando el fluoróforo FM 646 (Figura 12).

En el caso de la mutante E228K se detectó una baja expresión proteica después de la transfección, aunque se examinó la expresión durante más de 48 horas. Al analizar la localización celular de la proteína mutante, su retención intracelular se hizo evidente al comparar su localización con la proteína silvestre y con el fluoróforo de retículo endoplasmático. Aunque la imagen no resulta del todo clara se puede presumir que la mutante efectivamente se queda retenida en retículo endoplasmático.

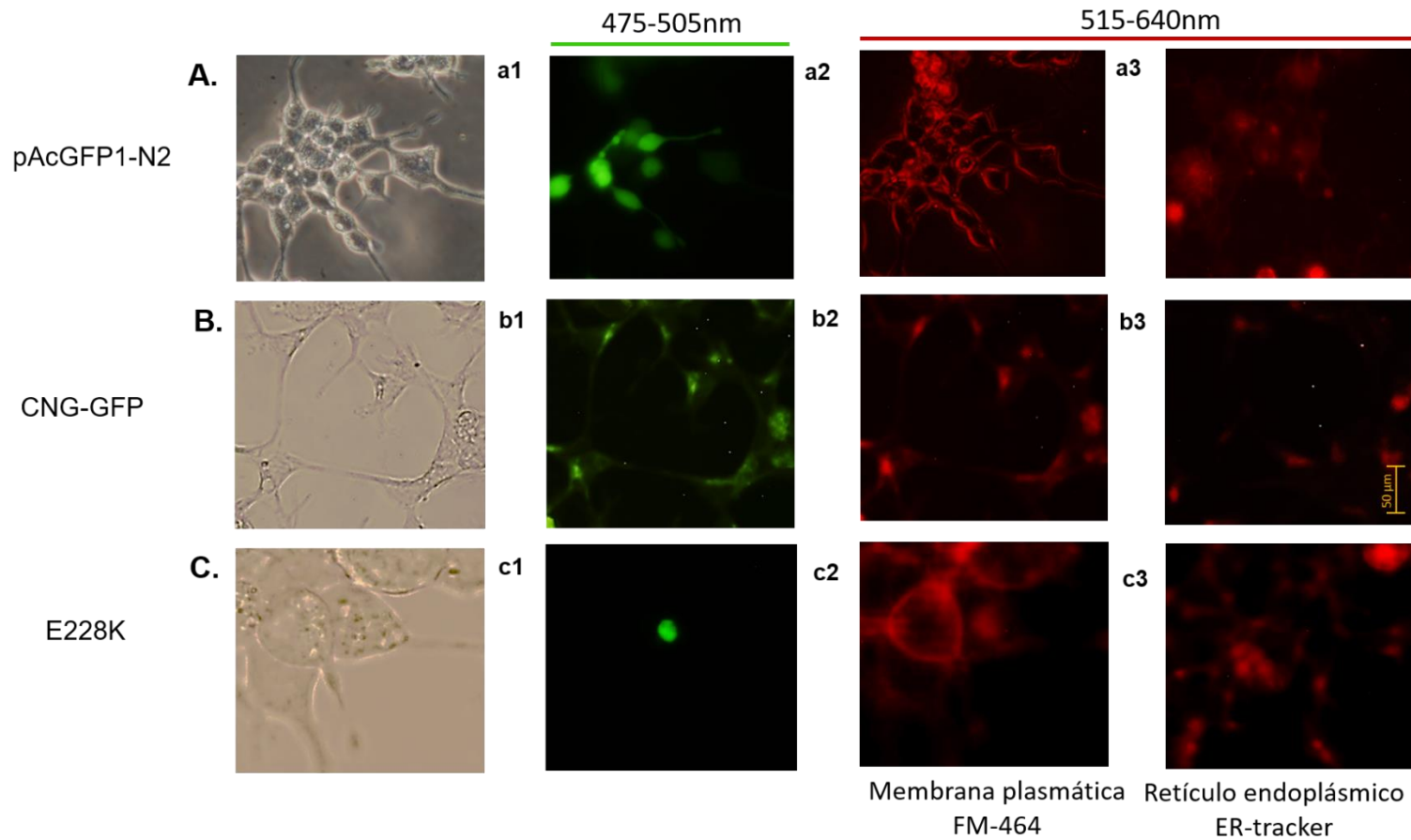


Figura 12. Ensayos de Co-localización de Control positivo pAcGFP1-N2, canal silvestre CNG-GFP y mutante E228K. A. Células HEK-293 transfectadas con pAcGFP1-N2, observadas en campo claro **a1**- Células transfectadas expresando la proteína verde fluorescente **a2**- células transfectadas, marcadas con FM-464 en la membrana plasmática **a3**- células transfectadas, marcadas con ER-tracker en retículo endoplásmico. B. Células HEK-293 transfectadas con el canal silvestre CNG-GFP, observadas en campo claro **b1**- Células transfectadas expresando la proteína verde fluorescente en la membrana plasmática de la célula **b2**- células transfectadas, marcadas con FM-464 en la membrana plasmática **a3**- células transfectadas, marcadas con ER-tracker en retículo endoplásmico. C. Células HEK-293 transfectadas con la mutante E228K, observadas en campo claro **c1**- Células transfectadas expresando la proteína verde fluorescente en el interior de la célula **b2**- células transfectadas, marcadas con FM-464 en la membrana plasmática **a3**- células transfectadas, marcadas con ER-tracker en retículo endoplásmico.

VIII. DISCUSIÓN

Los canales CNG fueron descubiertos en 1985 por Fresenko y colaboradores en la membrana plasmática del otro segmento de las células fotorreceptoras presentes en la retina del ojo (Fresenko y cols., 1985).

En el presente trabajo se estudió la localización intracelular de la mutante E228K evidenciada en el año 2008 por Reuter y cols. nuestros resultados sustentan la hipótesis que ellos plantearon pues en los ensayos de co-localización realizados, encontramos ausente la proteína en membrana plasmática (Reuter y cols., 2008). Se observa un cambio en la morfología de la célula al realizar la transfección de la mutante E228K, con respecto al canal silvestre, lo que podría ser un indicativo de estrés en retículo endoplásmico debido a la perturbación generada en él por la acumulación de proteínas mal plegadas como consecuencia de la mutación E228K.

La estructura cristalizada de un canal CNG de *Caenorhabditis elegans* en estado abierto proporcionó un nuevo marco para comprender los mecanismos de permeación de iones, apertura y cierre de canales (Li y cols. 2017): de manera que se utilizó esta estructura para ubicar topológicamente la mutante E228K mediante el software UCSF Chimera 1.11.2 disponible de manera gratuita en <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>. La mutación estudiada se localiza en el segmento intracelular que conecta el S2 con el S3, en la región correspondiente al sensor de voltaje del canal CNG, el cambio del ácido glutámico, un aminoácido con carga negativa por la lisina, un aminoácido con carga positiva. La lisina posee una cadena lateral protonable que favorece la formación de puentes de hidrógeno, debido a esto podría formar interacciones con otras proteínas dentro de los distintos compartimientos celulares, explicando así la retención intracelular de la proteína, la probable interacción de la mutante E228K con otras proteínas se analizó mediante la formación de puentes de Hidrógeno mediante la herramienta FindHbonds de Chimera 1.11.2 (Anexo 6) sin embargo, no se aprecia la formación de puentes de hidrógeno, ni

en la forma de canal silvestre con ácido glutámico en la posición 228 ni con la mutación a lisina en la misma posición.

Los compuestos fluorescentes que penetran en la célula y son altamente selectivos para organelos, son una estrategia ampliamente utilizada para ensayos de tráfico intracelular y co-localización, la principal ventaja de utilizar esta técnica es que las células permanecen intactas. FM-464 ha sido utilizado ampliamente para estudiar el tráfico vesicular ([Vida y Emr, 1995](#); [Hoffmann y Mendgen, 1998](#); [Fischer-Parton y cols., 2000](#); [Read y Hickey, 2001](#); [Atkinson y cols., 2002](#); [Hickey y cols., 2002](#)), en el caso de ER-tracker ha sido utilizado principalmente en el estudio de canales de Potasio sensibles a ATP (Hambrock A y cols., 2002). En el año 2007 Tamkun y cols. sugirieron que la localización de canales iónicos puede ser dependiente del citoesqueleto, debido a que se encuentra involucrado en procesos como la endocitosis y exocitosis, en el futuro evaluar la estabilidad del citoesqueleto mediante marcadores fluorescentes permitiría observar las interacciones de las proteínas mutantes con esta estructura entramada y definir cómo el proceso de migración se ve afectado (Tamkun y cols., 2007).

Los resultados en el presente trabajo permiten afirmar que E228K atribuye su efecto patogénico a su incorrecta localización, quedando retenida en intracelularmente, pudiendo disminuir la densidad de canales que se encuentran expresándose en la membrana plasmática perjudicando así su función, pero no suprimiéndola por completo, esto a su vez explicaría porque los portadores de esta mutante presentan cuadros de acromatopsia incompleta.

IX. CONCLUSIÓN

Los ensayos de localización realizados para la mutante E228K permiten confirmar que un cambio en la secuencia nucleotídica de estos canales, afecta a su localización y en consecuencia a su función. Los resultados de este proyecto sientan las bases para el estudio futuro de diversas mutantes de estos canales que, por su incorrecta localización, afectan su función, favoreciendo el desarrollo de patologías de la visión como la acromatopsia.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Arno , G., Carss , K., Hull , S., Zihni , C., Robson, A., Hardcastle , A., . . . Webster , A. (2017). Biallelic Mutation of ARHGEF18, Involved in the Determination of Epithelial Apicobasal Polarity, Causes Adult-Onset Retinal Degeneration. *American journal of human genetics*.
- Atkinson, H., Daniels, A., & Read, N. (2002). Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Science direct*, 233-244.
- Biel, M., & Michalakis, S. (18 de Septiembre de 2007). Function and Dysfunction of CNG Channels: Insights. *Molecular Neurobiology*, 266-277.
- Blobel, G. (2000). Protein targeting. . *Biosci. rep*, 303-344.
- Botelho, H. M., Uliyakina, I., Awatade, N. T., Proença, M. C., Tischer, C., Sirianant, L., . . . Amaral, M. D. (Marzo de 2015). Protein Traffic Disorders: an Effective High-Throughput Fluorescence Microscopy Pipeline for Drug Discovery. *Scientific Reports*.
- Chapman , H., Ramström , C., Korhonen , L., Laine , M., Wann , K., Lindholm , D., . . . Törnquist , K. (2005). Downregulation of the HERG (KCNH2) K(+) channel by ceramide: evidence for ubiquitin-mediated lysosomal degradation. *Journal of cell science*.
- Contreras JE, Holmgren M. Access of quaternary ammonium blockers to the internal pore of cyclic nucleotide-gated channels: implications for the location of the gate. *J Gen Physiol*. 2006;127:481–494
- Contreras, J., Srikumar, D., & Holmgren, M. (2008). Gating at the selectivity filter in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 3310-3314.
- Contreras , J., Cheng, J., Lau, A., Jogini , V., Roux, B., & Holmgren, M. (2010). Voltage profile along the permeation pathway of an open channel. *Biophysical Journal*, 2863-2869.
- Craven, K. B., & Zagotta, W. N. (2004). Salt Bridges and Gating in the COOH-terminal Region of HCN2 and CNGA1 Channels. *J Gen Physiol*, 663-677.
- Curran, J., & J. Mohler, P. (Febrero de 2015). Alternative Paradigms for Ion Channelopathies: Disorders of Ion Channel Membrane Trafficking and Posttranslational Modification. *Annual Review of Physiology*, 74, 505-524.
- Deutsh, C. (2002). Potassium channel ontogeny. *Annual reviews physiology*.
- Duricka, D. L., Brown, L., & Varnum, M. D. (2012). Defective trafficking of cone photoreceptor CNG channels induces the unfolded protein response and ER-stress-associated cell death. *Biochemical Society*, 685-696.
- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Elsevier*, 431-437.
- Fesenko, E., Kolesnikov, S., & Lyubarski, A. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*, 310-313.

- Ficker , E., Dennis , A., Wang, L., & Brown , A. (2003). Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circulation research*.
- Fischer-Parton, S., Parton , R., & Hickey , P. (2000). Confocal microscopy of FM-464 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal Microscopy*, 246-259.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 59-74.
- Guo , Y., Hernandez, I., Isermann, B., Kang , T., Medved , L., Sood, R., . . . Weiler , H. (2009). Caveolin-1-dependent apoptosis induced by fibrin degradation products. *Blood*.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., & Quast , U. (2002). Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology*, 995-1004.
- Haynes , L., & Yau , K. (1985). Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature*.
- Hickey, P., & Read, N. (2009). Imaging living cells of *Aspergillus* in vitro. *Medical mycology*, 110-119.
- Hickey, P., Jacobson , D., Read , N., & Glass, N. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology*, 109-119.
- Hoffman, E. P. (1995). Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride and calcium regulation in skelet muscle. *Ann Rev Med*, 431-441.
- Holmgren M. Influence of permeant ions on gating in cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen Physiol*. 2003;121:61–72
- Kagan , A., Yu, Z., Fishman , G., & McDonald , T. (2000). The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *The journal of biological chemistry*.
- Leandro, P., & Gomes, C. (2008). Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Bentham Science* .
- Li M, Jan YN, Jan LY. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*. 1992 Aug 28;257(5074):1225–1230.
- Li , M., Zhou , X., Wang, S., Michailidis , I., Gong , Y., Su , D., . . . Yang, J. (2017). Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel. *nature*.
- Lopez-Rodriguez, A., & Holmgren, M. (2012). Restoration of Proper Trafficking to the Cell Surface for Membrane Proteins Harboring Cysteine Mutations. *Plos One*.
- Noah , G., Yoni , H., Stacey , S. C., Kevin , D. B., & Zagotta, W. N. (2011). Molecular mechanism for 3: 1 subunit stoichiometry of rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nature communications*.
- Paoletti, P., Young, E., & Siegelbaum, S. A. (1999). C-Linker of Cyclic Nucleotide-Dgated Channels Controls Coupling of Ligand Binding to Channel Gating. *J. Gen. Physiol*, 113, 17-33.
- Peer, W. A. (2011). Plasma membrane protein trafficking. *The Plant Plasma Membrane*.

- Rajamani, S., Anderson, C., Anson, B., & January, C. (2002). Pharmacological rescue of human K(+) channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation*.
- Reuter, P., Koeppen, K., Ladewig, T., Kohl, S., Baumann, B., & Wissinger, B. (2008). Mutations in CNGA3 impair trafficking or function of cone cyclic nucleotide-gated channels, resulting in achromatopsia. *Human mutation*.
- Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T., & Adesnik, M. (1982). Mechanisms for the Incorporation of proteins in membrane organelles. *The journal of cell biology*, 1-22.
- Schon, C., Biel, M., & Michalakis, S. (2013). Gene replacement therapy for retinal CNG channelopathies. *molecular genetics and genomics*.
- Schroder, M., Clark, R., Chuan, Y. L., & Kauffman, R. J. (2004). The unfolded protein response represses differentiation through the RPD3-SIN3 histone deacetylase. *The embo journal*.
- Stylianou, M., Schön, C., Becirovic, E., & Biel, M. (2017). Gene therapy for achromatopsia. *The journal of gene medicine*.
- Tamkun, M., O'Connell, K., & Rolig, A. (2007). A cytoskeletal-based perimeter fence selectively corrals a sub-population of cell surface Kv2.1 channels. *Journal of cell science*.
- Tzivoni, D., Gavish, A., Zin, D., Gottlieb, S., Moriel, M., Keren, A., . . . Stern, S. (1988). Prognostic significance of ischemic episodes in patients with previous myocardial infarction. *The american journal of cardiology*.
- Ueno, S., Nakanishi, A., Sayo, A., Kominami, T., Ito, Y., Hayashi, T., . . . Terasaki, H. (2017). Differences in ocular findings in two siblings: one with complete and other with incomplete achromatopsia. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*.
- Vembar, S., & Brodsky, J. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews: Molecular cell biology*.
- Zheng, J., Trudeau, M., & Zagotta, W. (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron*, 891-896.
- Zobor, D., Werner, A., Stanzial, F., Benedicenti, F., Rudolph, G., & Ulrich, K. (2017). The Clinical Phenotype of CNGA3-Related Achromatopsia: Pretreatment Characterization in Preparation of a Gene Replacement Therapy Trial. *Visual neuroscience*.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Mutagénesis de E228K (Quikchange mutagénesis site-directed)

MEZCLA PARA PCR

2.5µl buffer de reacción
1.5µl ADN (CNG-GFP [80ng/µl])
1.25µl primer 5' (cng03)
1.25µl primer 3' (cng04)
0.5µl PFU polimerasa
0.5µl dNTP's
1.5µl Quiksolution
16µl H₂O miliQ

CONDICIONES DE PCR

1 ciclo	94°C	2min	
1 ciclo	94°C	30seg	} 18 ciclos
1 ciclo	72°C	45seg	
1 ciclo	72°C	15min	
1 ciclo	72°C	15min	
	4°C	∞	

ANEXO 2. Protocolo de transformación de bacterias por choque térmico

- 1.- Colocar 10 μ L [\sim 300 ng] del producto de PCR en 50 μ L de células, mezclar suavemente por inversión (NO pipetear).
- 2.- Incubar en hielo por 20 min.
- 3.- Dar un choque térmico a 42°C por 35 seg.
- 4.- Dejar recuperar en hielo por 3 min.
- 5.- Añadir 700 μ L de S.O.C. medium invitrogen® e incubar en agitación a 37°C 250 rpm 2h
- 6.-Plaquear 350 μ L en cajas petri de LB + Kan e incubar a 37°C toda la noche.

ANEXO 3. Extracción de ADN plasmídico E228K QIAGEN PLASMID MINI

- 1.- Centrifugar por 15 minutos a 4,000 rpm el preinóculo de células DH5 α expresando el plásmido pACGFP1-N2-CNG y desechar el sobrenadante.
- 2.- Resuspender el precipitado con 300 μ L de buffer P1 (Tris-Cl50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, RNase A 100 mg/mL)
- 3.- Agregar 300 μ L del buffer P2 (10 mM NaOH, 200 mM, SDS1%) y mezclar gentilmente por inversión, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Añadir 300 μ L de buffer P3 (3.0 M acetato de potasio, pH 5.5) y mezclar por inversión. Incubar 5 minutos en hielo y centrifugar por 30 minutos a 14,000 rpm a 4°C.
- 5.- Equilibrar las columnas utilizando 1 mL de buffer QBT y dejar filtrar por gravedad.
- 6.- Añadir el sobrenadante de la centrifugación y permitir que fluya a través de la columna por gravedad.
- 7.- Lavar dos veces con 1 mL de buffer QC (NaCl1.0 M; MOPS 50 mM, pH 7.0; isopropanol 15%).
- 8.- Desechar tubo colector y colocar la columna en un tubo nuevo.

9.- Diluir el ADN con 800 μ L de buffer QF (833 ml de NaCl 3M. 100 ml Tris 1M, pH 8.5; 300 ml de etanol. Agua miliQ hasta 2 litros).

10.- Añadir 0.7 volúmenes de isopropanol al ADN recuperado y centrifugar por 30 minutos a 13,000 rpm, decantar el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol al 70%

11.- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos.

12.-Desechar el sobrenadante y secar la pastilla de ADN, para enseguida re-suspender el ADN en 50 μ L de agua miliQ.

ANEXO 4. Transfección a células HEK-293

Para el control negativo se utilizaron células sin transfectar, para el control positivo el vector sin el inserto [1 µg], el canal silvestre [1 µg] de DNA y para la mutante E228K [1.5 µg] de DNA.

- 1- Retirar medio y añadir 1mL de PBS 1x, evitando que las células se despeguen, retirar PBS.
- 2- Añadir 1mL de Tripsina e incubar a 37°C 5% CO₂ * 5min
- 3- Tomar las células tripsinizadas y colocarlas en eppendorf 1.5 mL homogeneizar y colocar 30µL aprox. En cámara Neubauer y contar.
- 4- Centrifugar a 1,300 rpm * 5 min, eliminar sobrenadante y agregar 1 mL de medio suplementado con SFB 10% y estreptomina/penicilina 5%.
- 5- Homogeneizar y de acuerdo al conteo en la cámara colocar 4-5X10⁵ células aprox. En placas de 35mm. Incubar 16-18h a 37°C 5% CO₂

Mezclar:

- 200 µL de Optimem
 - 1 µg de DNA
 - 12.5 µL de Lipofectamine 2000
- Dejar incubar 5-10min

- 1- Colocar la mezcla del lipofectante/DNA plasmídico, en la Placa Petri de 35 mm, que contiene las células adheridas e incubar a 37°C 5% CO₂
- 2- Incubar 24-48 h

*Observar en el microscopio de fluorescencia transcurridas 24-48h.

ANEXO 5. Co-localización con FM-464 y ER-tracker

FM-464

Ex/Em
515/640nm

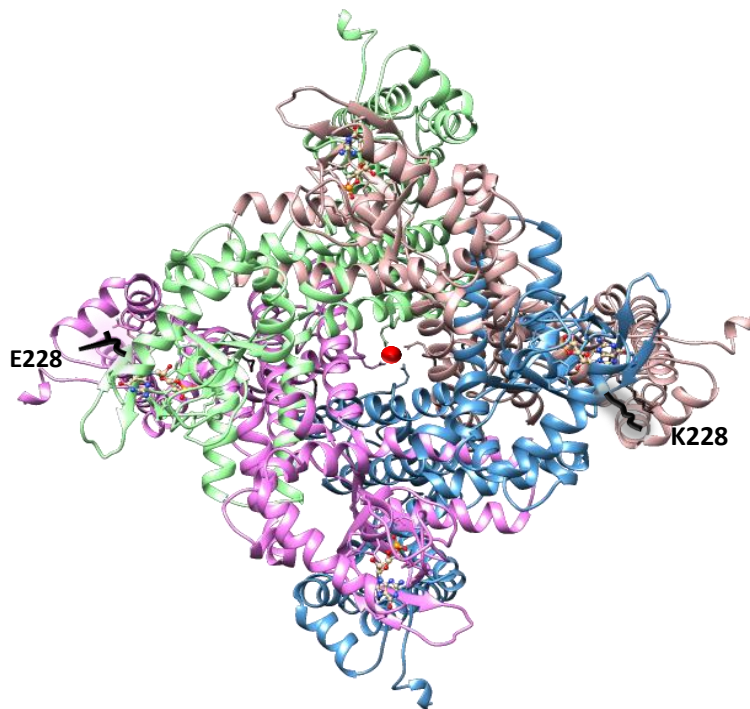
- 1.- Preparar solución de trabajo 5 µg/mL en PBS 1x frío.
- 2.- Retirar medio de cultivo, colocar la solución de trabajo y dejar actuar durante 1min (de preferencia incubar en frío)
- 3.- Retirar la solución y se reemplazar por PBS 1x a temperatura ambiente
- 4.- Visualizar en el microscopio de fluorescencia.

ER-Tracker

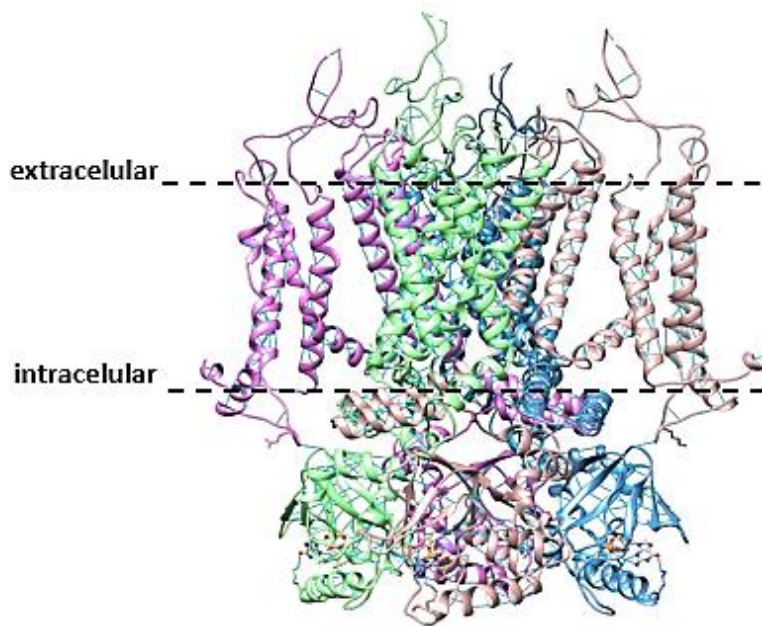
Ex/Em
587/615nm

- 1.- Remover el medio y lavar cuidadosamente con PBS 1x
- 2.- Agregar la solución previamente atemperada (100 µL), se lleva a 500 µl utilizando PBS 1x
- 3.- Incubar aproximadamente 15-30min a 37°C en condiciones de oscuridad.
- 4.- Reemplazar la solución de tinción con medio completo fresco y visualizar las células usando un microscopio de fluorescencia.

ANEXO 6. Localización y formación de puentes de Hidrógeno de E228 en la estructura del Canal CNG



Vista axial interna del canal CNG. Se observa la estructura tetramérica del canal y a la izquierda se muestra la localización del residuo E228 y a la derecha en la subunidad el cambio al residuo K228.



Formación de puentes de Hidrógeno de E228K en el canal CNG. la mutación E228K no afecta la formación de puentes de hidrógeno (representados con líneas azules conectando los átomos en la estructura del canal). Sin embargo, esta mutación localizada en la región intracelular justo al límite interior de la membrana plasmática podría ser importante para establecer las interacciones con proteínas intracelulares o de citoesqueleto que definan su migración y localización celular.