



# Universidad Austral de Chile

---

Facultad de Ciencias  
Escuela de Bioquímica

**Profesor Patrocinante**

**Dr. LUIS PABLO CID**

**CENTRO DE ESTUDIOS CIENTÍFICOS  
(CECS)**

**Profesor Copatrocinante**

**Dr. CARLOS GONZALEZ**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA**

## **ESTUDIO DEL MECANISMO DE APERTURA DEL CANAL DE CLORURO CIC-2 MEDIANTE MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA EN LA C256A**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Grado de ***Licenciado en  
Bioquímica*** y al Título profesional  
de ***Bioquímico***

**LEANDRO ANTONIO ZÚÑIGA HORMAZÁBAL**

Valdivia Chile

2002

**A MIS PADRES Y HERMANOS POR SU CARIÑO Y APOYO INCONDICIONAL.**

## **AGRADECIMIENTOS**

En forma muy especial quiero agradecer a mi profesor patrocinante Dr. Luis Pablo Cid, quien con su constante apoyo y dedicación contribuyó al desarrollo de esta tesis como también a la formación de un potencial hombre de ciencia. A los profesores integrantes de mi comisión de tesis Dr. Carlos Gonzáles y Dr. Alejandro Yáñez.

A la Dra. María Isabel Niemeyer, quien forma parte del equipo de laboratorio y que con sus consejos y enseñanzas aportó en este trabajo y con ello permitió que éste llegara a buen término.

Debo agradecer en forma muy especial al Dr. Francisco Sepúlveda, quien me permitió desarrollar este trabajo en el laboratorio que él dirige y de quien siempre recibí constante ayuda tanto teórica como práctica.

También merecen un reconocimiento importante mis compañeros de mesón, de quienes aprendí mucho con respecto a la forma de trabajar en un laboratorio y abordar los diferentes problemas, entre ellos destaco las enseñanzas de Diego Varela, Marcelo Catalán y Omar Porras de quienes recibí tanto críticas constructivas como voces de apoyo.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Estudios Científicos (CECS) y fue financiado por el proyecto fondecyt N° 1000622.

## INDICE DE CONTENIDOS

	Pág
INDICE DE CONTENIDOS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
1. <b>RESUMEN</b> .....	1
SUMMARY.....	2
2. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1 Familia de canales de cloruro CIC.....	4
2.2 Canal de cloruro CIC-2.....	6
2.21 Expresión del mRNA.....	6
2.22 Expresión recombinante del CIC-2.....	6
2.23 Expresión del CIC-2 en células nativas.....	11
2.24 Rol fisiológico propuesto para el CIC-2.....	11
2.3 Mecanismos de apertura de los canales de cloruro CIC.....	13
2.4 Hipótesis de trabajo.....	18
2.41 Objetivo general.....	18
2.42 Objetivos específicos.....	18
3. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1 Biología molecular.....	19

3.11	Diseño de partidores.....	19
3.12	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).....	19
3.13	Mutagénesis sitio dirigida.....	20
3.14	Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T..	21
3.15	Transformación de células competentes DH5 $\alpha$ con reacción de ligación.....	22
3.16	Digestión de DNA con la enzima de restricción BstE II.....	23
3.17	Purificación de DNA plasmidial.....	23
3.18	Subclonamiento del DNA mutado en pCR3.1/rCIC-2.....	24
3.19	Transfección transitoria en células HEK-293.....	25
3.2	Electrofisiología.....	26
3.21	Teoría de la técnica de <b>patch-clamp</b> .....	26
3.22	Obtención de corrientes macroscópicas.....	27
3.23	Registros de <b>patch-clamp</b> en su configuración de célula entera.....	28
3.24	Análisis de datos.....	30
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	33
4.1	Mutagénesis sitio dirigida.....	37
4.2	Expresión de canales en células transfectadas.....	42
4.3	Propiedades de compuerta.....	46
4.31	Cinética de activación.....	46
4.32	Cinética de cierre.....	49

4.33	Estudio de la selectividad.....	53
5.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	58
6.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	63

## INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1	Familia de canales de Cloruro CIC..... 7
Figura 2	Estructura de una subunidad de StCIC..... 8
Figura 3	Estructura del filtro de selectividad de StCIC..... 8
Figura 4	Representación en cintas de la estructura dimérica del StCIC..... 9
Figura 5	Alineamiento de las secuencias aminoácidas de los canales CIC-0, CIC-1 y CIC-2..... 15
Figura 6	Esquema cinético propuesto para los canales de cloruro CIC..... 17
Figura 7	Circuito electrónico de la técnica de <i>Patch Clamp</i> ..... 28
Figura 8	Variante de célula completa de la técnica de patch clamp..... 28
Figura 9	Procedimiento esquemático para la generación mutaciones sitio dirigidas..... 34
Figura 10	Productos de amplificación por PCR..... 35
Figura 11	Análisis de restricción DNA plasmidial extraído de células transformadas con la reacción de ligación del producto de PCR final y el vector pGEMT..... 37
Figura 12	Análisis de restricción..... 39
Figura 13	Análisis de restricción de DNA plasmidial..... 41
Figura 14	Expresión de canales en células HEK-293 transfectadas..... 43
Figura 15	Dependencia de voltaje de la activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A..... 45
Figura 16	Dependencia de tiempo de la activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A.... 47

Figura 17	Fracciones de amplitud de activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A.....	48
Figura 18	Constantes de tiempo de desactivación de rCIC-2 y rCIC-2C256A.....	51
Figura 19	Fracciones de amplitud de desactivación.....	52
Figura 20	Selectividad aniónica de rCIC-2.....	55
Figura 21	Selectividad aniónica de rCIC-2C256A.....	56

## INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Potenciales de reversión( $E_{rev}$ ) medidos para rCIC-2 y rCIC-2C256A...	57
Tabla 2	Razón de permeabilidad para rCIC-2 y rCIC-2C256A.....	57

## ABREVIATURAS

C	Cisteína
CIC	Chloride channel
C212S	Mutación de la cisteína 212 por serina
C256A	Mutación de la cisteína 256 por alanina
C277S	Mutación de la cisteína 277 por serina
HEK-293	Human embryonic kidney cell-293
GΩ	Gigaohm
h	Hora
IPTG	Isopropil β-Dtiogalacto-piranósido
I	Corriente macroscópica
mV	Milivoltios
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
ml	Mililitro
μM	Micromolar
μl	Microlitro
nM	Nanómolar
pA	Picoamperios
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
pCR3.1/rCIC-2	cDNA del rCIC-2 clonado en el vector de expresión pCR3.1

pb	Pares de bases
pS	Picosiemens
Kb	Kilobases
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
Vm	Potencial de membrana

## 1. RESUMEN

Los canales de cloruro tipo CIC son proteínas de membrana que participan en diversas funciones celulares y mutaciones en los genes que los codifican son causa de enfermedades. Para explicar el mecanismo por el cual estos canales se abren y cierran se propuso el modelo de doble cañón, basado en estudios en CIC-0 de *T. marmorata*. Según este modelo, existirían dos poros idénticos que se abren mediante compuertas rápidas independientes y una compuerta lenta común, ambas sensibles al potencial de membrana. El estudio del mecanismo de compuerta de CIC-2 presenta dificultades por su baja conductancia de canal único. Una forma alternativa de estudio es la mutación de aminoácidos potencialmente involucrados en dicho mecanismo. Pérdida de dependencia de potencial de la compuerta lenta, por mutaciones en la cisteína 212 del CIC-0 y la homóloga del CIC-1 humano (C277), han sido reportados previamente.

En la presente tesis se muestran los resultados de la evaluación funcional de la mutación en la cisteína homóloga del canal CIC-2 (C256). Mediante la técnica de **patch-clamp**, se estudiaron las propiedades electrofisiológicas relacionadas con el mecanismo de compuerta y de poro. Los resultados muestran un cambio de ~30 mV en la dependencia de potencial, un aumento de la probabilidad mínima de apertura en ~20 %, además de alterarse la cinética de apertura y cierre. La secuencia de permeabilidad del canal a diferentes aniones no se modificó. Estos resultados sugieren que la mutación C256 en CIC-2 pone de manifiesto al menos dos mecanismos de compuerta, uno de ellos homologable a la compuerta lenta descrita para CIC-0 y 1.

## SUMMARY

CIC-type chloride channels are membrane proteins that perform a variety cellular functions, and several mutations in their coding genes lead to disease. Based on previous investigation of CIC-0, a so-called double-barrelled model has been proposed to explain the channel voltage dependent opening and closing. In this model two identical pores are gated independently (fast gates) and a common slow gate controls both pores at the same time. In CIC-0 and CIC-1 a single point mutation of a conserved cysteine, C212 in CIC-0 and C277 in human CIC-1, has been shown to abolish or greatly reduce the contribution of the slow gate. This residue is conserved in CIC-2, a channel of ~50 % homology with CIC-0 and 1. The study of the gating mechanism of CIC-2 has been hampered by its low single-channel conductance. One way to approach the problem might be to attempt the molecular identification of the gate by site specific mutagenesis. In the present thesis a functional evaluation of a mutation in the conserved cysteine of CIC-2, which corresponds to C256 in the rat, is presented. The functional analysis was carried out using the patch-clamp technique, studying the gating and pore features. CIC-2C256A showed altered gating with a shift by ~30 mV of the voltage-dependence curve. The minimum open probability was increased to about ~20 % and both opening and closing kinetics were affected. The pore properties were not altered as deduced from a study of the permeability sequence for different anions.

These results suggest that in CIC-2 there are at least two gating mechanisms, one of which resembles the slow gating of CIC-0 and CIC-1.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) es el anión que se encuentra en mayor concentración en el espacio extracelular en sistemas multicelulares. Su movimiento a través de las membranas tanto plasmáticas como de organelos citoplasmáticos es mediado por transportadores y canales iónicos.

En cuanto a los transportadores de cloruro identificados se ha determinado que estos no consumen ATP en forma directa, sino más bien utilizan la energía generada por los gradientes de otros iones y con ello movilizan cloruro en contra de su gradiente de potencial electroquímico. Ejemplos de estos son los cotransportadores  $\text{NaCl}$  y  $\text{NaK}_2\text{Cl}$ , que acoplan el gradiente de sodio generado por la bomba  $\text{Na,K ATPasa}$  para generar la entrada de cloruro a la célula. Los cotransportadores de  $\text{KCl}$  acoplan el movimiento de cloruro al gradiente inverso de potasio, permitiendo la salida de cloruro de la célula.

Otro tipo de transportadores como los intercambiadores involucrados en la regulación del pH también afectan el gradiente de cloruro, este es el caso del intercambiador de  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$  el cual acumula cloruro al secretar  $\text{HCO}_3^-$ .

El movimiento pasivo a favor del gradiente de cloruro a través de canales iónicos ocurre por la acumulación o disminución de cloruro dentro de la célula, por acción de procesos de transporte activo secundario.

Este movimiento a través de canales iónicos participa en procesos tales como la regulación de la excitabilidad celular, transporte transepitelial de sales, regulación del volumen celular y acidificación de organelos citoplasmáticos.

Entre los canales de cloruro identificados molecularmente se encuentran los canales activados por ligando (receptores de glicina y GABA), CFTR, familia de canales de cloruro CIC y CLCA (canales de cloruro activados por calcio).

## **2.1 Familia de canales de cloruro CIC**

La familia de canales iónicos CIC (chloride channel) está formada por nueve proteínas de membrana encontradas en mamíferos clonados por homología a partir de CIC-0 clonado desde el órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990). Además, existen homólogos en diversos organismos entre los que se encuentran plantas (Miyazaki *et al.*, 1999) levaduras (Gaxiola *et al.*, 1998) y bacterias (Mindell & Maduke, 2001) (ver figura 1).

La importancia fisiopatológica de los canales CIC, ha sido demostrada por la relación causal existente entre mutaciones en alguno de sus miembros y enfermedades. Entre estas enfermedades se encuentran la miotonía congénita relacionada con mutaciones en CIC-1 (Koch *et al.*, 1992), enfermedad de Dent relacionada con mutaciones en CIC-5 (Lloyd *et al.*, 1996), síndrome de Bartter relacionado con mutaciones en CIC-Kb (Simon *et al.*, 1997) y osteopetrósis con CIC-7 (Kornak *et al.*, 2001).

La topología propuesta inicialmente para la familia CIC, obtenida mediante el análisis hidropático realizado para el primer canal clonado CIC-0, arrojó 13 dominios potenciales de transmembrana (Jentsch *et al.*, 1990). Posteriormente, mediante estudios bioquímicos tanto de mutagénesis, protección de proteasas, como de

modificación de cisteínas se postuló que los canales CIC tendrían entre 8-10 dominios de transmembrana y los extremos carboxilo y amino terminal orientados hacia el espacio intracelular (Schmidt-Rose & Jentsch, 1997); (Kuchenbecker *et al.*, 2001).

Un gran avance en la comprensión de la estructura de los canales CIC provino de estudios recientes mediante cristalografía de rayos X, de los canales de origen bacteriano, StCIC (*Salmonella typhimurium*) y EcCIC (*Escherichia coli*) respectivamente (Dutzler *et al.*, 2002). Entre los principales hallazgos de este estudio están:

- 1) El modelo topológico es altamente complejo presentando dieciocho alfa hélices denominadas A-R, las que en su mayoría no atraviesan por completo la membrana (ver figura 2).
- 2) La disposición espacial de las alfa hélices identificadas en la membrana es de forma antiparalela, la que permite la presencia del cloruro en el centro de la membrana de manera energéticamente favorable.
- 3) Se identificaron las regiones que forman el filtro de selectividad canal (ver figuras 3-4).
- 4) Además se demostró que los canales CIC presentan una estructura cuaternaria dimérica, con dos poros formados por cada subunidad. Confirmando con ello los estudios iniciales de canal único en CIC-0 que evidenciaban la estructura de doble poro (Miller, 1982).

Los canales cristalizados presentan un 11 % de identidad con respecto los CIC de origen mamífero, este bajo porcentaje se debe principalmente a la existencia en éstos últimos de extremos tanto amino como carboxilo terminal de un largo mucho

mayor al de los canales bacterianos. Sin embargo, regiones tan importantes como el filtro de selectividad son prácticamente idénticas y algunas regiones de transmembrana son altamente conservadas entre los canales tipo CIC, incluyendo a los canales de origen mamífero.

## **2.2 Canal de cloruro CIC-2**

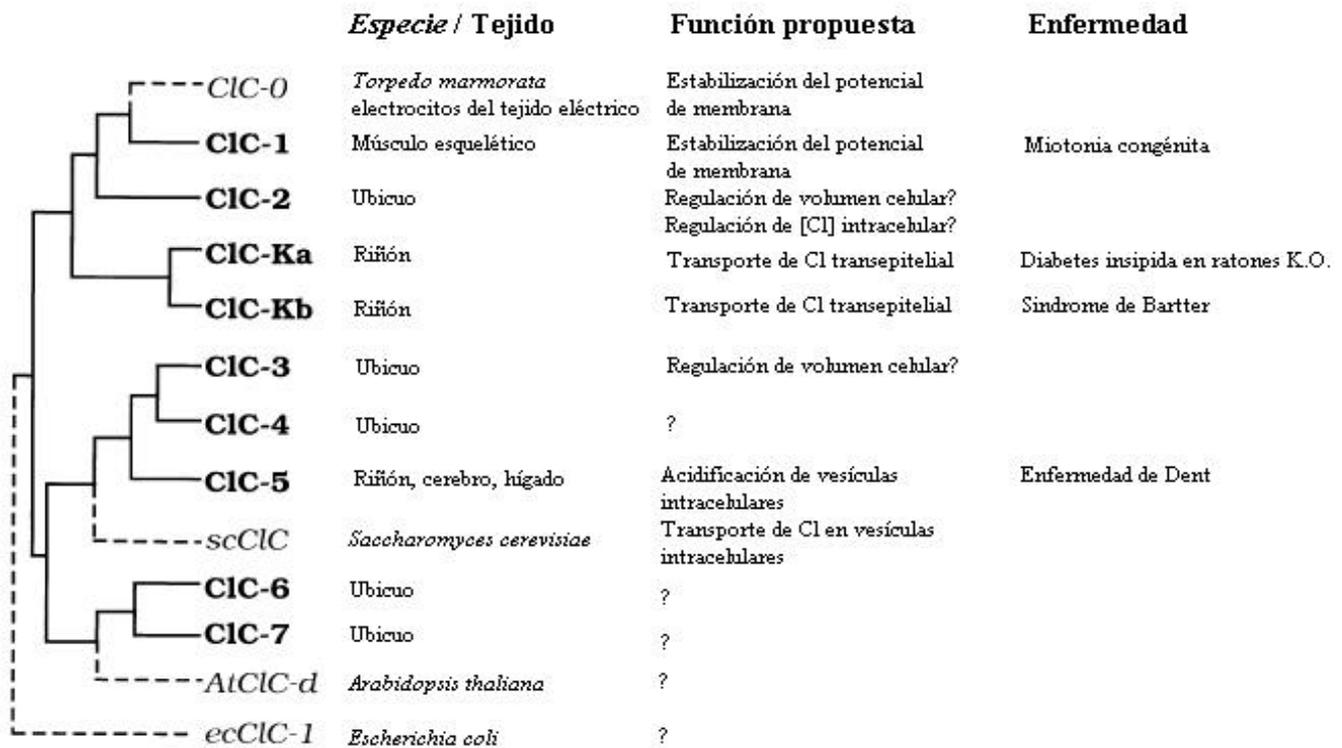
### **2.2.1 Expresión del mRNA**

El RNA mensajero de CIC-2 presenta una expresión ubicua, lo que ha sido demostrado mediante las técnicas de Northern blot, RT-PCR e hibridación *in-situ* encontrándose en diferentes tipos celulares como por ejemplo: células epiteliales de intestino, riñón y páncreas, neuronas entre otras (Thiemann *et al.*, 1992). Esta expresión contrasta con otros integrantes de la familia CIC que presentan una expresión tejido específica como por ejemplo CIC-1 que solamente expresado en tejido muscular así como también las isoformas CIC-ka y CIC-kb que son específicas del riñón (ver figura 1).

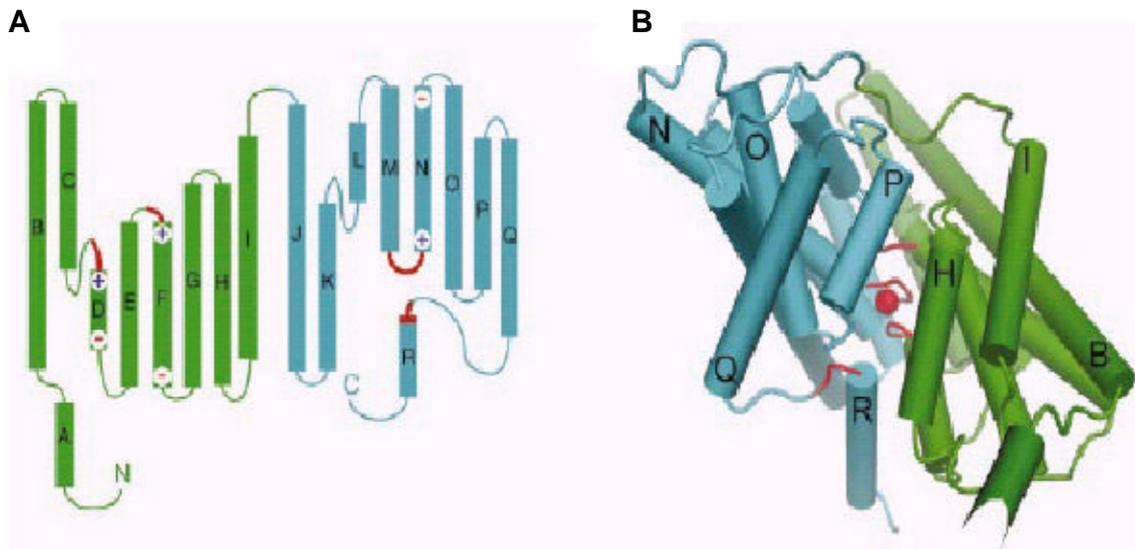
### **2.2.2 Expresión recombinante de CIC-2**

La expresión recombinante de CIC-2 tanto en oocitos como en células de origen mamífero, tales como las HEK-293, han permitido su estudio y caracterización, determinándose que es un canal de lenta activación a potenciales hiperpolarizantes

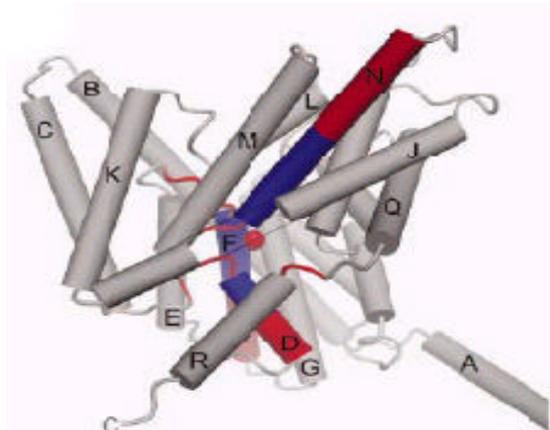
## La Familia CIC de canales de cloruro



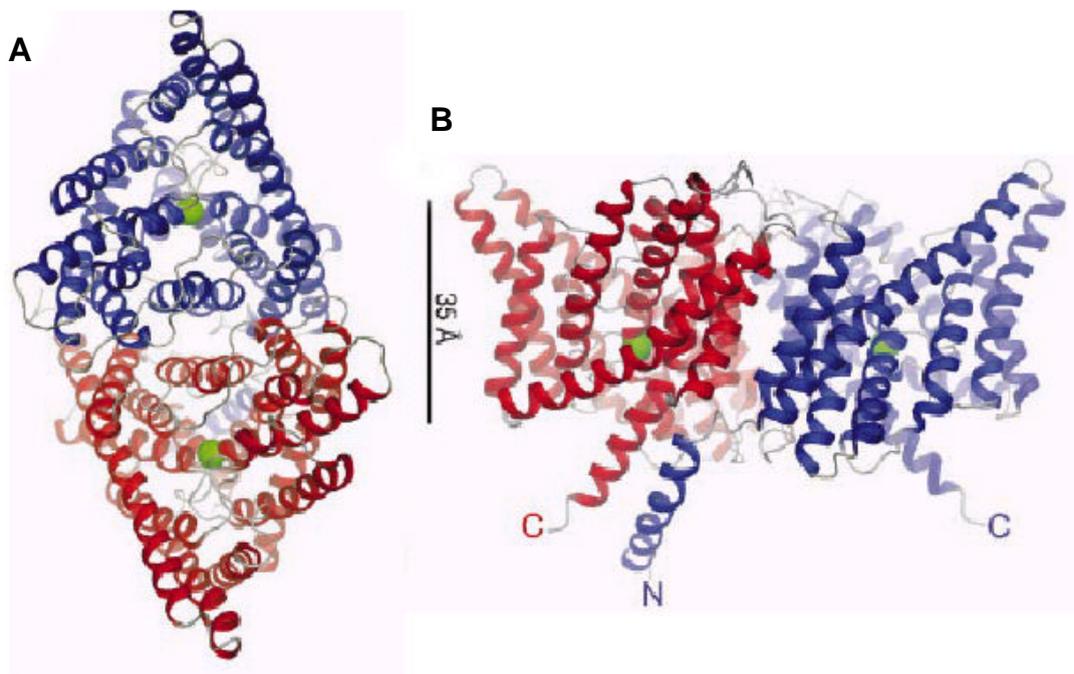
**Figura 1. Familia de canales de Cloruro CIC.** Canales de cloruro encontrados y agrupados de acuerdo al grado de homología que presentan con respecto al primer canal clonado (CIC-0), se indica ubicación, función y enfermedades asociadas a ciertos miembros de esta familia (Jentsch, T. et al, 1996).



**Figura 2. Estructura de una subunidad de StCIC.** **A)** representación en forma de cilindros de las regiones  $\alpha$ -hélice denotadas (A-R), se indica las regiones formadoras del filtro de selectividad mediante color rojo **B)** representación espacial de las regiones  $\alpha$ -hélice, indicándose además la presencia de un ión cloruro (esfera de color rojo) (Dutzler, R. et al, 2002).



**Figura 3. Estructura del filtro de selectividad de StCIC.** Regiones  $\alpha$ -hélice representadas en forma de cilindros con sus correspondientes denominaciones (A-R), indicándose las regiones formadoras del poro, estando la región intracelular en orientado hacia abajo y la región extracelular hacia arriba (Dutzler, R. et al, 2002).



**Figura 4. representación en cintas de la estructura dimérica del StCIC. A)** Plano superior mostrando la presencia de dos iones de cloruros uno en cada poro (esferas de color verde) **B)** vista lateral de la representación. La ubicación de cada subunidad es representada por un color diferente (rojo y azul) (Dutzler, R. et al, 2002).

(Grunder *et al.*, 1992) y que se encuentra en su estado cerrado en condiciones basales. También puede ser activado por diferentes estímulos como aumento hipotónico del volumen celular (Grunder *et al.*, 1992), pH extracelular ácido (Jordt & Jentsch, 1997), desestabilización del citoesqueleto por medio de reactivos como citocalasina D (Ahmed *et al.*, 2000).

El estudio del canal recombinante ha permitido establecer las características biofísicas y farmacológicas de este canal.

Entre las propiedades biofísicas del CIC-2 se encuentran:

1 - Secuencia de selectividad característica  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ .

2 - Los procesos de activación y desactivación son dependientes de tiempo y voltaje, siendo además ajustables a una función exponencial doble.

3 - Desde el punto de vista farmacológico no existen inhibidores específicos de CIC-2, sin embargo mediante el uso de una batería de inhibidores se ha logrado una buena identificación, siendo también de gran importancia para este fin los fármacos que no ejercen efecto sobre el canal.

CIC-2 es inhibido por:

- $\text{Cd}^{+2}$  (100  $\mu\text{M}$ ) Y  $\text{Zn}^{+2}$  (100  $\mu\text{M}$ )

-9-AC (anthracene-9-carboxylic acid) en una concentración de 1 mM

-DPC (diphenylamine-2-carboxylic acid) 1 mM

-NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) 0.5 mM

No presenta inhibición por:

-DIDS (4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid)

-Tamoxifeno

### 2.2.3 Expresión de CIC-2 en células nativas

El canal de cloruro CIC-2 es una proteína de 908 aminoácidos (ver figura 5) y de ~99 KD. Mediante estudio de *patch-clamp* evaluando tanto propiedades biofísicas como farmacológicas antes mencionadas es posible identificar corrientes tipo CIC-2, que muy probablemente reflejan la expresión funcional del canal. Dichas corrientes se han encontrado en neuronas (Clark *et al.*, 1998); (Smith *et al.*, 1995), células gliales (Ferroni *et al.*, 1997); (Nobile *et al.*, 2000), células de Sertoli (Bosl *et al.*, 2001), células de Leydig (Bosl *et al.*, 2001), células del pigmento retinal (Bosl *et al.*, 2001), células acinares de la parótida (Arreola *et al.*, 1996) y células de colon distal (Catalan *et al.*, 2002). Sin embargo, esta identificación debe ser confirmada mediante un estudio en el modelo *knock-out*, lo que sólo ha sido demostrado para células acinares de la parótida (Nehrke *et al.*, 2002), de Sertoli, Leydig y del pigmento retinal (Bosl *et al.*, 2001).

Además se han identificado corrientes tipo CIC-2 en líneas celulares T84 (células de colon humano); (Fritsch & Edelman, 1997) y células Caco2 (epitelio intestinal humano); (Mohammad-Panah *et al.*, 2000).

### 2.2.4 Rol fisiológico propuesto para CIC-2

En cuanto al rol fisiológico que cumpliría CIC-2, no existe consenso por el momento, sin embargo existen varias hipótesis propuestas por diferentes investigadores entre las que se encuentran:

- función reguladora de la concentración de cloruro del medio intracelular (Staley *et al.*, 1996).
- regulación del volumen celular (Grunder *et al.*, 1992); (Furukawa *et al.*, 1998); (Xiong *et al.*, 1999).
- participación en el proceso de formación de pulmón y riñón (Murray *et al.*, 1995); (Blaisdell *et al.*, 1999); (Huber *et al.*, 1998).
- participación en el transporte transepitelial (Schwiebert *et al.*, 1998).(Mohammad-Panah *et al.*, 2000;Catalan *et al.*, 2002)
- participación en la secreción gástrica (Malinowska *et al.*, 1995).
- participación en el ciclo celular (Furukawa *et al.*, 2002).

No obstante las hipótesis propuestas, el modelo *knock-out* del CIC-2 en ratón no contribuyó al esclarecimiento del rol funcional, mostrando solo cambios degenerativos en testículos (espermatogonias) y retina (fotorreceptores). En ambos tipos de tejidos existe un contacto muy estrecho entre estos últimos y células epiteliales de soporte (células de Sertoli y células epiteliales del pigmento retinal respectivamente). La degeneración se inicia cuando se comienza a formar la barrera hemato-testicular y hemato-retinal, lo que sugiere un rol crítico del canal en el transporte a través de tales barreras (Bosl *et al.*, 2001). Sin embargo, la existencia de mecanismos de compensación activados en respuesta a la falta de una proteína en etapas muy tempranas del desarrollo, podrían enmascarar otras funciones expresadas posteriormente una vez terminado el desarrollo.

### 2.3 Mecanismos de apertura de los canales de cloruro CIC

Para los canales CIC se ha propuesto un modelo de doble cañón basado principalmente en estudios electrofisiológicos realizados en bicapas de vesículas de membrana plasmática del órgano eléctrico de *T. marmorata*. Mediante estudios de canal único se identificó dos niveles de conductancia igualmente espaciados de ~10 pS y ~20 pS además de periodos inactividad (cero conductancia). La distribución de estos estados de conductancia se ajustaron a una distribución binomial siendo la primera evidencia de la estructura de doble poro confirmada recientemente por la estructura cristalizada. El modelo de doble cañón establece la existencia de dos poros idénticos que pueden abrirse y cerrarse en forma independiente el uno del otro mediante compuertas rápidas o **fast gates** y otro mecanismo que controlaría ambos poros en forma simultánea mediante una compuerta lenta o **slow gate**. Ambos procesos dependientes de potencial. Sin embargo esto sólo ha sido demostrado para los canales CIC-0 y CIC-1 lo que se logró mediante el estudio de la actividad de canal único (Miller, 1982); (Saviane *et al.*, 1999) (ver figura 6).

En publicaciones recientes mutaciones en residuos de cisteína tanto en CIC-0 (C212S) (Lin & Chen, 2000) como en la cisteína homóloga del CIC-1 (C277S) (Accardi, A.2001), provocaron la pérdida de la dependencia de potencial de la compuerta lenta, presumiblemente a causa de una estabilización de dicha compuerta en su estado abierto. La mutación en CIC-0 no afectó la compuerta rápida y mostró además una estrecha relación con el efecto de inhibición mediado por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , estos cationes

ejercerían su efecto alterando la compuerta lenta, por tal motivo esta mutación genera la pérdida de inhibición por estos cationes divalentes (Chen, 1998; Lin *et al.*, 1999).

En CIC-1 la mutación afectó en un grado mucho menor la compuerta rápida a diferencia de CIC-0, lo que sugiere que existe una relación más estrecha entre ambas compuertas, a diferencia CIC-0. Para CIC-2 no existen estudios de canal único que permitan el análisis de los mecanismos de compuerta, por lo tanto una de las formas de estudiar y postular un modelo es mediante la identificación de las compuertas propuestas mediante el estudio de las corrientes macroscópicas.

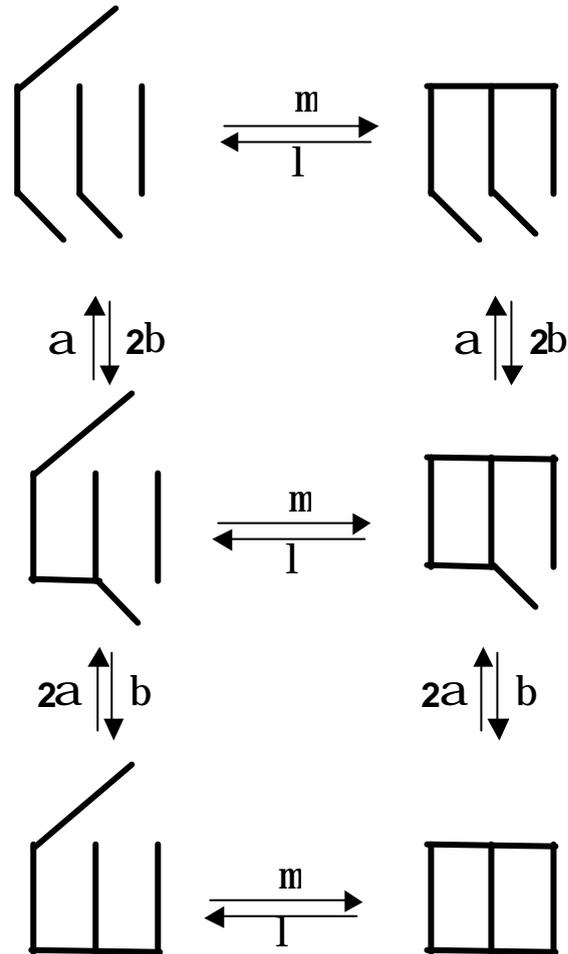
CIC-2 junto con CIC-1 y CIC-0 forman parte de la primera rama de la familia CIC (ver figura 1), esta rama sólo es integrada por canales que se expresan en la membrana plasmática y tienen alrededor de un 50 % de identidad. La presencia en CIC-2 de un residuo de cisteína homólogo a los anteriormente mencionados (ver figura 5), permite postular un papel en los mecanismos de compuerta análogo a los de CIC-0 y CIC-1. De verificarse esta predicción, se podría especular que las compuertas presentes en los canales mejor estudiados también están presentes en CIC-2.

En el siguiente trabajo se muestran los resultados obtenidos al generar la mutación sitio dirigida en la cisteína 256 por alanina (C256A) y su efecto en las propiedades electrofisiológicas del CIC-2. El estudio de los canales tanto mutados como tipo silvestre fue realizado por medio de la técnica de **patch-clamp**. Dicha técnica permite el análisis de la dependencia de voltaje de la activación, la cinética de apertura y cierre y el estudio de la selectividad a diferentes aniones.

	1	50
ClC-0	(1)	-----
hClC-1	(1)	MEQSRSQQRGGEQSWWGS DPQYQYMPF E HCTSYG L PSEN GGLQHRLRKDA
rClC-2	(1)	-----MAAATAAAATVAG E GMEPRAL Q YE Q TLMYGR Y TQ E L
Consensus	(1)	AA M E AL EN L R D
	51	100
ClC-0	(1)	----MSHEKNEASGY P E A OSWKS O EAMLGART E VS-----RWRRAVK
hClC-1	(51)	GPRHNVHP T Q I YGH H K E Q F S D R E O D I G M P K K T G S S S T V D S K D E D H Y S K C Q
rClC-2	(37)	G A F A K E E A A R I R L G G P E P W K G S P S A R A T P E L L E Y G -----Q S R C A R C R
Consensus	(51)	G H N I G H P E F S K Q D A L P K T E S R W A K C K
	101	150
ClC-0	(38)	N C L Y R H --- L V K V L G E D W I F L L L G A L M A L V S W A M D F I G S R G L R F Y K Y L F
hClC-1	(101)	D C I H R L G Q W R R K L G E D W I F L V L L G L L M A L V S W S M D Y V S S L Q A Y K W S Y
rClC-2	(80)	I C S V R C H K F L V S R V G E D W I F L V L L G L L M A L V S W A M D Y A I A V C L Q A Q Q W M S
Consensus	(101)	C I H R L V K K L G E D W I F L V L L G L L M A L V S W A M D Y I A K L Q A Y K W L F
	151	200
ClC-0	(85)	A L V E G N I G L Q Y L V W V C Y P L A L I L F S S L F C Q I V S P Q A V G S G I P E L K T I I R G
hClC-1	(151)	A Q M O P S L P L O F L V W V T F P L V L I L F S A L F C H L I S P O A V G S G I P E M K T I L R G
rClC-2	(130)	R G L N T N I L L Q Y L A W V T Y P V V L I T F S A G F T Q I L A P Q A V G S G I P E M K T I L R G
Consensus	(151)	A L N N I L Q Y L V W V T Y P L V L I L F S A L F C Q I I S P Q A V G S G I P E M K T I L R G
	201	250
ClC-0	(135)	A V I H E Y L T I R T F V A K T V G L T V A L S A G F P L G K E G P F V H I A S I C A T L I N O I L L
hClC-1	(201)	V V L K E Y L T M K A F V A K V V A L T A G L G S G I P V G K E G P F V H I A S I C A A V L S K F L
rClC-2	(180)	V V L K E Y L T L K T F V A K V I G L T C A L G S G M P L G K E G P F V H I A S M C A A L L S K F L
Consensus	(201)	V V L K E Y L T L K T F V A K V V G L T A L G S G I P L G K E G P F V H I A S I C A A L L S K F L
	251	300
ClC-0	(185)	C F I S G R R E E P Y Y L R A D I I T V G C A L G I S C C F G T P L A G V L F S I E V T C S H F G V
hClC-1	(251)	S V F C G V Y E Q P Y Y Y - S D I L T V G C A V G V G C C F G T P L G G V L F S I E V T S T Y F A V
rClC-2	(230)	S L F G I Y E N E S R N - T E M L A A C A V G V G C C F A A P I G G V L F S I E V T S T F F A V
Consensus	(251)	S L F G I Y E N P Y Y S D I L T V G C A V G V G C C F G T P L G G V L F S I E V T S T H F A V
	301	350
ClC-0	(235)	R S Y W R G F L G G A F S A F I F R V L S V W V K D T V T L T A L F K T N F R G D I P F D L Q E M P
hClC-1	(300)	R N Y W R G F F A A T F S A F V F R V I A V W N K D A V T I T A L F R T N F R M D F P F D L K R I P
rClC-2	(279)	R N Y W R G F F A A T F S A F I F R V L A V W N R D E E T I T A L F K T R F R L D F P F D L Q E L P
Consensus	(301)	R N Y W R G F F A A T F S A F I F R V L A V W N K D V T I T A L F K T N F R L D F P F D L Q E L P
	351	400
ClC-0	(285)	A F A I I G I A S G F F G A L F V Y L N R O I I V F M R K K N F V T K I L K K Q R L I Y P A V V T F
hClC-1	(350)	A F A A T G T C C G L L G A V F Y I H R O V M L G V R K H K A L S O F L A K H R I L Y P G I V T F
rClC-2	(329)	A F A V I G I A S G F G A L F V Y L N R K I V Q V M R K Q T I N R F L M K R L L F P A L V L L
Consensus	(351)	A F A I I G I A S G F G A L F V Y L N R Q I I L M R K K I S K F L K R L L Y P A I V T F
	401	450
ClC-0	(335)	V L A T L R F P P G V G O F F G A G L M P R E T I N S L F D N Y T W K T I I --- D P R G L G N S A
hClC-1	(400)	V I A S F T F P P G M G O F M A G E L M P R E A I S T L F D N T W V K H A G --- D P E S L G O S A
rClC-2	(379)	L I S T L T F P P G F G Q F M A G Q L S Q K E T L V T L F D N R T W V R Q G L V E D L G A P S T S Q
Consensus	(401)	V I A T L T F P P G M G Q F M A G L M P R E T I T L F D N T W V K A D P A L G N S A
	451	500
ClC-0	(382)	Q W F I P H L N I F I V M A L Y F V M H F W M A A L A V T M P V P C G A F V P V F N L G A V L G R F
hClC-1	(448)	V W I H P R V N V V I I F I F F V M K F W M S I V A T T M P I P C G G F M P V F V I G A A F G R L
rClC-2	(429)	A W S P P R A N V F L T L V I F I L M K F W M S A L A T T I I P V P C G A F M P V F V I G A A F G R L
Consensus	(451)	W P R L N V F I I I L F F V M K F W M S A L A T T M P V P C G A F M P V F V L G A A F G R L
	501	550
ClC-0	(432)	V G E I M A L L F P D G L V S N G N L Y H I L P G E Y A V I G A A A M T G A V T H A V S T A V I C F
hClC-1	(498)	V G E I M A M L F P D G I L F D D I I Y K I L P G G Y A V I G A A A L T G A V S H T V S T A V I C F
rClC-2	(479)	V G E S M A A W F P D G I H T D S S T Y R I V P G G Y A V V G A A A L A G A V T H T V S T A V I V F
Consensus	(501)	V G E I M A L L F P D G I L S D I Y K I L P G G Y A V I G A A A L T G A V T H T V S T A V I C F
	551	600
ClC-0	(482)	E L T G O I S H V I P M M V A V I L A N M V A O G L O P S L Y D S I I O I K K L P Y L P E L S W S S
hClC-1	(548)	E L T G O I A H I L P M M V A V I L A N M V A O S L O P S L Y D S I I O V K K L P Y L P D L G W N Q
rClC-2	(529)	E L T G Q I A H I L P V M I A V I L A N A V A O S L O P S L Y D S I I R I K K L P Y L P E L G W G R
Consensus	(551)	E L T G Q I A H I L P M M V A V I L A N M V A O S L O P S L Y D S I I Q I K K L P Y L P E L G W
	601	650

C1C-0	(532)	ANKYNIQVGDIMVRDVTSIASTSTYGDLLHVLRQTKLKFPPFVDTPTDNT
hC1C-1	(598)	LSKYTI FVEDIMVRDVK FVSASYTYGELRLLQT TTVKTLPLVDSKDSMI
rC1C-2	(579)	HQQYRVRVVEDIMVRDVPHVALSCTFRDLRLALHRTKGRMLALVESPESMI
Consensus	(601)	NKY I VEDIMVRDV VAAS TYGDLR LL TKLK LPLVDSKDSMI
		651 700
C1C-0	(582)	LLGSI DRTEVEG LLQRRI SAYRRQPAAAAEA DEEGRN-----GETG
hC1C-1	(648)	LLGSVERS ELQALLQRHLCPE RRLRAAQEMARKLSELPYDGKARLAGEGP
rC1C-2	(629)	LLGSIERS QVVALLGAQLSPARRRQHMQKLRKAQMSP-----PSD
Consensus	(651)	LLGSIERSEV ALLQR LSP RR AAQ LAK GES
		701 750
C1C-0	(623)	ASFTGEAES SFAYIDOEDAEGQQREG-----LEAVKVQTEDPRPP
hC1C-1	(698)	PGAPPGRPE SFAFVDEDEDELSGKSELPPSLALHPSTTAPLSPEEPNGP
rC1C-2	(669)	QESPPSSET SIRFQVNTEDSGFPGAHG-----QTHKPLKPKRGP
Consensus	(701)	APP AES SFAYIDNDEDEG G T PL PEPDRGP
		751 800
C1C-0	(663)	SPVPAEEPQTSGIYOKK-----
hC1C-1	(748)	LPGHKQOPEAPEPAGORPSIFQSLH-----CLLGRARP
rC1C-2	(710)	SNATSLQEGT TGNMESAGIALRSLFCGSPPLESTTSELEKSESCDKRKLK
Consensus	(751)	SPA A QP T I QK SL R
		801 850
C1C-0	(681)	-QKGTGQV ASRF EEMLTLEEIYRWEQREKNVVNFETCR IDQSPFQLVEG
hC1C-1	(782)	TKKKTQDSTDLVDNMSPFEIEAWROEOLSQPVC FDSCC IDQSPFQLVEQ
rC1C-2	(760)	RVRISLASDSDLGKMSPEEILEWEQQLDEPVNFSDCK IDPAPFQLVER
Consensus	(801)	K T Q ASDLED MSPEEI WEQ QL PVNFSDCKIDQSPFQLVE
		851 900
C1C-0	(730)	TSLOKTHTLFSLGLDRAYVTSMGKLVGVVALAEIOAAIEG-SYQKGFRL
hC1C-1	(832)	TTIHKTHTLFSLGLHLAYVTSMGKIRGVLALEELOKAIEG-HTKSQVOL
rC1C-2	(810)	TSLHKTHTLFSLGLVDHAYVTSIGRLIGIVTLKELRKAIEG SVTAQGVKV
Consensus	(851)	TSLHKTHTLFSLGLD AYTSMGKLVGVVAL ELQKAIEG T GVKL
		901 950
C1C-0	(779)	P PPLASFR DVKHARNSGR TATSNSSGK-----
hC1C-1	(881)	R PPLASFRNITSTRKSTGAPPSSAENWNLPEDRPGATGTGVIAASPETP
rC1C-2	(860)	R PPLASFRDSATSSSDTETTEVHALWG--PRSRHGLPREGTPSDSDDKCKQ
Consensus	(901)	RPPLASFRDS SSR ST T S A P R G G A
		951 1000
C1C-0	(806)	-----
hC1C-1	(931)	VPSPSPPEPLSLAPGKVEGELEEELELVESPGLEEEELADILQGPSLRSTDE
rC1C-2	(908)	-----
Consensus	(951)	-----
		1001
C1C-0	(806)	-----
hC1C-1	(981)	EDEDELIL
rC1C-2	(908)	-----
Consensus	(1001)	-----

**Figura 5. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de los canales C1C-0, C1C-1 y C1C-2.** Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI códigos de acceso X56758, CAA80996 y X64139 respectivamente. Se indican los residuos de cisteína homólogos, además de las regiones alfa hélice identificadas.



**Figura 6. Esquema cinético propuesto para los canales de cloruro CIC.** Modelo de doble cañón propuesto inicialmente para CIC-0, se representan las dos compuertas independientes que controlan cada protoporo (compuertas rápidas) y una compuerta común que controla ambos protoporos (compuerta lenta), además se indican las constantes de velocidad que controlan los diferentes estados cinéticos (Miller, 1982).

## **2.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La mutación del residuo de la cisteína 256 por alanina en el canal de cloruro rClC-2 afecta el mecanismo de compuerta del canal.

### **2.4.1 Objetivo general**

Estudiar la cinética del canal de cloruro rClC-2 mediante el estudio electrofisiológico de un canal recombinante al que se realizó un cambio de un residuo aminoácido específico utilizando la técnica de mutaciones sitio-dirigidas mediante oligonucleótidos.

### **2.4.2 Objetivos específicos**

1. Generación de la mutación sitio dirigida cisteína 256 por alanina en rClC-2.
2. Estudiar el efecto de la mutación puntual cisteína 256 por alanina sobre los mecanismos de compuerta propuestos para el rClC-2.
3. Evaluar el posible efecto que produce la mutación en las propiedades de poro.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Biología molecular

##### 3.1.1 Diseño de partidores

Se diseñaron dos partidores para la generación de la mutación puntual C256A, para ello se considero la secuencia nucleotídica del rCIC-2 (NCBI código de acceso X64139), un partidador mutagénico en orientación sentido sC256A (5'-TAGGAGTGGGCGCCTGCTTTGCCGCACC-3') y uno antisentido asC256A (5'-TGCGGCAAAGCAGGCGCCCACTCCTACTGCG-3'), estos partidores presentan el cambio de triplete codificante para el residuo aminoácido cisteína por el triplete codificante para el aminoácido alanina (el cambio nucleotídico se indica en negrita y subrayado), además se diseñaron dos partidores no mutagénicos uno de los cuales esta en orientación sentido AT-8 (5'-GCTACCCCAGAGCTCCTA-3') y esta ubicado río arriba del sitio a mutar y un partidador antisentido TRB-D8 (5'-GGGAAGAGCAGCCGTTTC-3') ubicado río abajo de este sitio. Estos partidores fueron sintetizados por Metabion (Alemania).

##### 3.1.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termo ciclador Perkin Elmer GeneAmp 2400, usando las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94 °C

por 2 min seguidos de 20 ciclos con una temperatura de denaturación de 94 °C por 30 s, una fase de alineamiento a 60 °C por 45 s y una fase de elongación a 72 °C por 5 min, estas condiciones fueron utilizadas en todas las reacciones de PCR realizadas.

Las mezclas de reacción contenían alícuotas de las siguientes soluciones estándar: templado (DNA) de concentración 100 ng, 0.2 μM de cada partidor, 2.5 u.e. de DNA polimerasa *Pfu* (Roche), 100 μM de dNTPs y un volumen final de reacción de 50 μl.

### **3.1.3 Mutagénesis sitio dirigida**

La mutación sitio dirigida fue realizada mediante un protocolo estándar basado en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Ho *et al.*, 1989).

Este protocolo consiste en dos rondas de PCR, la primera corresponde a dos reacciones de PCR separadas, en cada una de éstas se usó como templado el cDNA de rCIC-2 clonado en el vector de expresión pCR3.1 (pCR3.1/rCIC-2) además de un partidor mutagénico y un partidor normal lo que generó dos productos de amplificación, uno por cada reacción.

Estos productos presentan una región terminal complementaria (región correspondiente a los partidores mutagénicos).

La segunda ronda del protocolo corresponde a una nueva PCR usando esta vez como templado los productos de amplificación obtenidos en la primera ronda, previa purificación mediante minicolumnas (Concert, Gibco) además del uso de los partidores normales en este caso TRB-D8 y AT-8 (ver figura 9).

### 3.1.4 Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T

El fragmento de PCR final fue sometido a un procedimiento para la adición de una adenosina extra en los extremos 5' terminal.

Para esto se utilizó 7  $\mu$ l de producto de PCR purificado, 1  $\mu$ l de buffer de reacción con  $MgCl_2$  Taq DNA Polimerasa 10 X, dATP en una concentración final de 0.2 mM, 1  $\mu$ l de Taq DNA Polimerasa en un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l. Esta mezcla fue incubada a 70 °C por 30 min y luego se utilizó 2  $\mu$ l en una reacción de ligación usando el vector pGEM-T (Promega).

Este vector presenta una timidina extra en ambos extremos 3' terminal lo que mejora la eficiencia de la reacción de ligación de poseer genes que confieren resistencia a antibióticos (ampicilina y kanamicina). Además posee el gen de la  $\beta$ -galactosidasa que permite la selección de las colonias que han sido transformadas con el vector religado (capaces de metabolizar la  $\beta$ -galactosa y presentan una coloración azul) de las colonias que presentan el vector ligado con el inserto deseado, el cual interrumpe la secuencia de este gen y por tal motivo son incapaces de metabolizar X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) y presentan un color blanco. El subclonamiento del producto de PCR en el vector pGEM-T tubo como objeto el generar grandes cantidades de DNA que presenta la mutación.

La reacción de ligación fue llevada a cabo usando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) durante 16 h a 4 °C en un volumen final de 20  $\mu$ l. La relación molar entre inserto y vector fue de 3/1, siendo la concentración del vector de 50 ng/  $\mu$ l.

### **3.1.5 Transformación de células competentes DH5 $\alpha$ con reacción de ligación**

La reacción de ligación fue posteriormente usada para transformar células competentes DH5 $\alpha$  (Gibco BRL), las cuales se descongelaron a 4 °C. A 50  $\mu$ l de células competentes se les agregó 3  $\mu$ l de reacción de ligación y se incubó en hielo por 30 min. luego se aplicó un golpe térmico por 1 min. a 37 °C y se incubó por dos minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 450  $\mu$ l de medio de cultivo LB sin antibiótico y se mantuvo por una hora a 37 °C con una agitación de 225 rpm. Esto último para la expresión de los genes de resistencia a antibióticos que proporciona el vector pGEM-T en las células transformadas efectivamente.

Transcurrido este tiempo se cultivó estas células en placas de agar con 100  $\mu$ l/ml de ampicilina, 50  $\mu$ l/ml de X-Gal y 20  $\mu$ l/ml de IPTG.

Las placas fueron incubadas a 37 °C toda la noche, luego de lo cual las colonias de color blanco fueron cultivadas en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina a 37 °C con agitación a 225 rpm. Luego se realizó la extracción de DNA plasmidial por el método de hervido (Holmes & Quigley, 1981), y se llevó a cabo un análisis de restricción para la confirmación de la existencia del inserto.

### **3.1.6 Digestión de DNA con la enzima de restricción BstE II**

Para confirmar la existencia del producto de amplificación en el plasmidio extraído de las bacterias transformadas con la reacción de ligación, se realizó un

análisis de restricción usando para ello el siguiente procedimiento: se tomó 15  $\mu$ l del DNA extraído y se agregó 2  $\mu$ l del buffer de digestión de la enzima (BstE II) 10 X, 2  $\mu$ l de RNAsa y 1  $\mu$ l de la enzima de digestión BstE II, luego se dejó incubando por una hora a 37 °C.

Finalmente el análisis de esta digestión fue realizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % usando como buffer de corrida TEA 1 X. Las bandas de DNA fueron visualizadas por medio de la tinción con bromuro de etidio en un transiluminador con una lámpara U.V. y fotografiadas para luego ser procesadas.

### **3.1.7 Purificación de DNA plasmidial**

Una vez confirmada la existencia del producto de amplificación, se seleccionó una de estas colonias y se dejó creciendo en medio de cultivo líquido LB, con lo cual se amplificó la cantidad de DNA. Este DNA fue extraído por medio del sistema de purificación de DNA Wizard plus midipreps (Promega) basado en lisis alcalina y purificación del DNA mediante resinas. La cantidad de DNA extraído de esta forma fue determinado por medio de un espectrofotómetro (Génesis 2) a una longitud de onda de 260 nm.

### **3.1.8 Subclonamiento del DNA mutado en pCR3.1/rCIC-2**

El siguiente paso consistió en extraer el fragmento que tiene la mutación desde el vector pGEM-T e incorporarlo al vector de expresión de rCIC-2. La digestión del

primero se realizó con la enzima BstE II (ver protocolo de digestión 4.16) recuperándose la banda de 381 pb. que correspondía al inserto. La banda fue extraída del gel y el DNA fue purificado mediante minicolumnas (Concert, Gibco BRL). Una vez extraído, el DNA fue ligado en el pCR3.1/rCIC-2 previamente digerido con BstE II y desfosforilado con fosfatasa alcalina intestinal (Roche) con lo que se restableció la secuencia del rCIC-2 con la mutación incorporada.

La reacción de ligación se realizó usando la T4-DNA ligasa (Promega) incorporando un control para evaluar la posible religación del vector, en que la única diferencia con respecto a la reacción de ligación experimental fue la falta del inserto, en este caso el DNA de 381 pb. Estas reacciones fueron utilizadas para transformar células competentes DH5 $\alpha$  (Gibco BRL), de haber crecimiento en las placas de agar sembradas con las células transformadas con la reacción de religación el experimento sería descartado y se debería repetir la reacción de ligación optimizando las condiciones de desfosforilación del vector pCR3.1/rCIC-2. Una vez que sólo se obtuvo crecimiento de bacterias en la placa experimental, el DNA aislado de las colonias crecidas fue analizado por medio de un ensayo de restricción con la enzima de restricción Nhe I. Esta enzima además de confirmar la existencia de la secuencia completa de rCIC-2 informaba acerca de la orientación en que se había ligado el inserto, debido a la presencia de un sitio de corte en el inserto y otro en el vector. Finalmente se confirmó la presencia de la mutación mediante la secuenciación del fragmento clonado incluyendo los sitios de restricción en los cuales se realizó el clonamiento (Medigenomix Alemania).

### 3.1.9 Transfección transitoria en células HEK-293

Para los estudios funcionales se utilizó la línea celular HEK-293, estas células fueron cultivadas en placas de vidrio de 60 mm de diámetro, usando medio DMEM/F-12 suplementado con un 5 % de suero bovino fetal e incubados a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>, luego de alcanzar entre un 60-80 % de confluencia, estas células fueron cotransfectadas con 0.9 µg del vector de expresión pCR3.1 que contiene el cDNA del rCIC-2 o rCIC-2C256A y 0.3 µg de  $\pi$ H3-CD-8 (este cDNA codifica para el cluster de diferenciación CD-8, antígeno de superficie que se expresa en la membrana) además de Lipofectamina Plus (Gibco BRL), según el protocolo descrito por el fabricante, luego las células fueron subcultivadas en placas de poliestireno de 35 mm de diámetro (Falcon) e incubadas por 24 h.

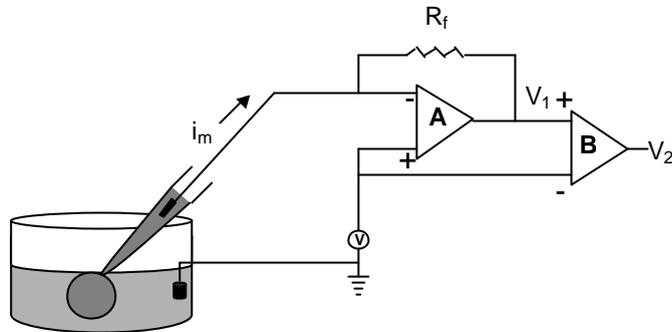
La expresión de CD-8 es utilizada como medio de identificación de las células que efectivamente habían sido transfectadas, esta identificación se realizó mediante microesferas (Dyna) cubiertas con el anticuerpo contra el CD-8. Después de 24 h de incubación las células transfectadas fueron puestas en contacto con estas microesferas por 3 min luego de lo cual se lavaron para eliminar el exceso de microesferas e inmediatamente se realizaron los estudios funcionales en las células marcadas.

## 3.2 Electrofisiología

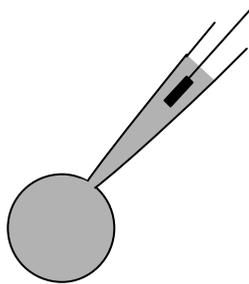
### 3.2.1 Teoría de la técnica de *patch-clamp*

La técnica *patch-clamp* es un método electrofisiológico desarrollado en 1979 por Neher y Sackmann (Neher & Sakmann, 1992), el cual permite el registro de corrientes a través de membranas biológicas de células generadas por la acción de canales iónicos. Mediante esta técnica se puede mantener y manipular el potencial de membrana permitiendo el estudio detallado de los canales dependientes de potencial. Esta técnica se basa en la formación de un sello con una alta resistencia la que es del orden de los giga ohm ( $G\Omega$ ) ( $10^9\Omega$ ), que se establece entre la pipeta vidrio que contiene al microelectrodo inmerso en la solución de pipeta y la región de membrana que hace contacto con la pipeta.

La pipeta en contacto con la célula puede controlar el potencial de membrana debido a que esta conectada a la entrada negativa de un amplificador operacional (amplificador **A** figura 7) conectado a una alta resistencia de retroalimentación, cuya entrada positiva esta sometida a un potencial (**V**). La corriente generada por los canales iónicos ( $i_m$ ) modifica el potencial impuesto a la pipeta, siendo esta modificación detectada por el amplificador vía electrodo de pipeta y con el objeto de mantener el potencial en el valor fijado, en la entrada negativa del amplificador A, pasa una corriente de igual magnitud de signo opuesto compensando esta variación. Por lo tanto el potencial de salida del amplificador A es igual a:



**Figura 7. Circuito electrónico de la técnica de *Patch Clamp*.** Básicamente este circuito actúa como un convertidor corriente-potencial. Esto permite convertir pequeñas corrientes en cambios en el potencial monitoreables desde un osciloscopio o ser digitalizados para su almacenamiento y posterior análisis.



**Figura 8. Variante de célula completa de la técnica de patch clamp.** Después de la formación del gigasello, se aplica una leve succión por la pipeta de registro. Como consecuencia de esto, el parche circunscrito a la pipeta se rompe, quedando la solución de pipeta en contacto con el contenido intracelular. La velocidad con que estos dos contenidos se equilibran dependerá del tamaño de la pipeta y de la resistencia de acceso.

$$V_1 = -i_m R_f + V$$

La entrada positiva del segundo amplificador (B) está conectada a la salida del primero (A) y la entrada negativa al generador de voltaje por tal motivo la función del segundo amplificador es sustraer  $V$  con el objeto de obtener un voltaje proporcional a la corriente de membrana y dicha corriente estará dada por la actividad de canales. Por tal motivo el voltaje a la salida del segundo amplificador ( $V_2$ ) es:

$$V_2 = -i_m R_f$$

Como el valor de la resistencia de retroalimentación se conoce, la magnitud generada por la actividad de canales iónicos se obtiene mediante la ecuación anterior.

### 3.2.2 Obtención de corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas son obtenidas mediante la medición simultánea de la corriente generada por una población de canales frente a un estímulo activador (voltaje), para medir esta corriente se utiliza una variante de la técnica de **patch-clamp** denominada célula entera (**whole cell**). Esta configuración consiste en romper mediante una leve succión la superficie de la membrana que esta en contacto con la pipeta de registro luego de la formación del giga-sello, con lo cual se puede manipular el contenido intracelular, debido a que producto de la ruptura de la superficie de membrana se produce un equilibrio entre la solución de pipeta y el contenido

intracelular, siendo el volumen de la solución de pipeta enormemente mayor al contenido intracelular.

Dependiendo de la configuración utilizada en la técnica de **patch clamp**, es posible la manipulación de la solución extracelular mediante un sistema de perfusión local, lo que permite el estudio de los canales frente a bloqueadores y agonistas, además de la caracterización de las propiedades biofísicas de cada canal.

### **3.2.3 Registros de *patch-clamp* en su configuración de célula entera.**

Las placas de poliestireno que contenían las células marcadas con microesferas fueron montadas en un microscopio invertido Nikon Diaphot y la medición de las corrientes fue por medio de un amplificador RK-400, todos los experimentos realizados fueron a temperatura ambiente (20-25 °C). La solución de baño fue perfundida por gravedad usando un perfusor local y la mantención constante del volumen de la solución de baño en la placa fue por medio de una bomba peristáltica Pharmacia, las pipetas utilizadas para las mediciones se hicieron en un estirador BB-CH (Mecanex Suiza) usando capilares de borosilicato (Harvard apparatus), las resistencias de pipeta variaban entre 2-3 M $\Omega$ .

Las corrientes registradas fueron digitalizadas mediante un computador equipado con un conversor análogo-digital/digital-análogo Digidata modelo 1200 (Axon Instruments), además se utilizó el programa de generación de pulsos Clampex (Axon Instruments).

La solución de pipeta utilizada en los experimentos de **patch-clamp** contenía 100 mM Nagluconato, 33 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4 y la solución de baño 140 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Sacarosa, 10 mM HEPES, pH 7.4. Para la determinación de la selectividad aniónica la solución de pipeta utilizada contenía 133 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4 y en la solución de baño se reemplazó 130 mM de NaCl por una cantidad equivalente de NaX, donde X representa Gluconato, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> o F<sup>-</sup>.

### 3.2.4 Análisis de datos

El análisis de los datos fue realizado por medio de los software Clampfit (Axon Instruments) y SigmaPlot. Los trazados de corrientes de activación y deactivación (corrientes de cola registradas a un potencial de +40 mV) fueron ajustadas a una función exponencial doble del siguiente tipo:

$$I(t) = a_1 e^{(-t/\tau_1)} + a_2 e^{(-t/\tau_2)} + c$$

Donde  $I(t)$  es la corriente en función del tiempo ( $t$ ),  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son las constantes de tiempo y  $a_1$  y  $a_2$  corresponden a las amplitudes de corrientes de los componentes respectivos y  $c$  corresponde a la amplitud de corriente constante en el estado estacionario. Las fracciones de amplitud  $A_1$ ,  $A_2$  fueron obtenidas dividiendo  $a_1$  y  $a_2$  por la corriente total obtenida, para la obtención de  $A_0$  en la activación se sumó  $a_1$ ,  $a_2$  y  $c$  y

el resultado fue dividido por la corriente total en este caso  $c$ , para  $A_0$  correspondiente a la deactivación se obtuvo dividiendo  $c$  por la suma de  $a_1$ ,  $a_2$  y  $c$ .

Para la determinación de la activación dependiente de potencial, las amplitudes de las corrientes de cola fueron ajustadas a la función exponencial doble y luego normalizadas a su máximo valor extrapolable y graficadas en función del protocolo de pulsos utilizado (potenciales). La así obtenida dependencia de voltaje fue ajustada a una ecuación de Boltzmann del siguiente tipo:

$$I = I_0 + \frac{I_{\max}}{1 + e^{\left(\frac{V - V_{1/2}}{b}\right)}}$$

Donde  $I$ ,  $I_0$  y  $I_{\max}$  son la corriente en función del voltaje, corriente residual independiente de voltaje y la corriente máxima en estado de completa activación obtenida por medio de la extrapolación respectivamente,  $V_{1/2}$  es el voltaje en el cual existe un 50 % de activación y  $b$  es la pendiente de dicha función.

La razón de permeabilidad ( $P$ ) fue calculada a partir del cambio en el potencial de reversión  $E_{\text{rev}}$  frente a un cambio en la concentración de cloruro, usando para ello la ecuación de Goldman-Hodkin-Katz:

$$E_{\text{rev},X} - E_{\text{rev},Cl} = \left(\frac{RT}{F}\right)n \left(\frac{P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_{Cl}[Cl^-]_o + P_X[X^-]_o}\right) - \left(\frac{RT}{F}\right)n \left(\frac{P_{Cl}[Cl^-]_{i^*}}{P_{Cl}[Cl^-]_{o^*}}\right)$$

Donde  $R$ ,  $T$  y  $F$  son la constante de los gases ideales, la temperatura medida en grados Kelvin y la constante de Faraday respectivamente,  $[X]$  corresponde a la concentración del anión de intercambio ( $\text{Gluc}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  o  $\text{F}^-$ ),  $[Cl^-]_o$  y  $[Cl^-]_{o^*}$

corresponden a la concentración de cloruro en la solución de baño antes y después del cambio anionico,  $[Cl^-]_i$  y  $[Cl^-]_{i^*}$  corresponden a la concentración de cloruro en la solución de pipeta antes y después del cambio aniónico.

Debido a que la solución de pipeta se mantiene constante en todos los experimentos de intercambio de aniones, la razón de permeabilidad es simplificada a la siguiente expresión:

$$\frac{P_X}{P_{Cl}} = \left( \frac{[Cl^-]_{o^*}}{[Cl^-]_o} \right) e^{\frac{(E_{rev, Cl} - E_{rev, X}) \times F}{RT}} - \frac{[Cl^-]_o}{[X^-]_o}$$

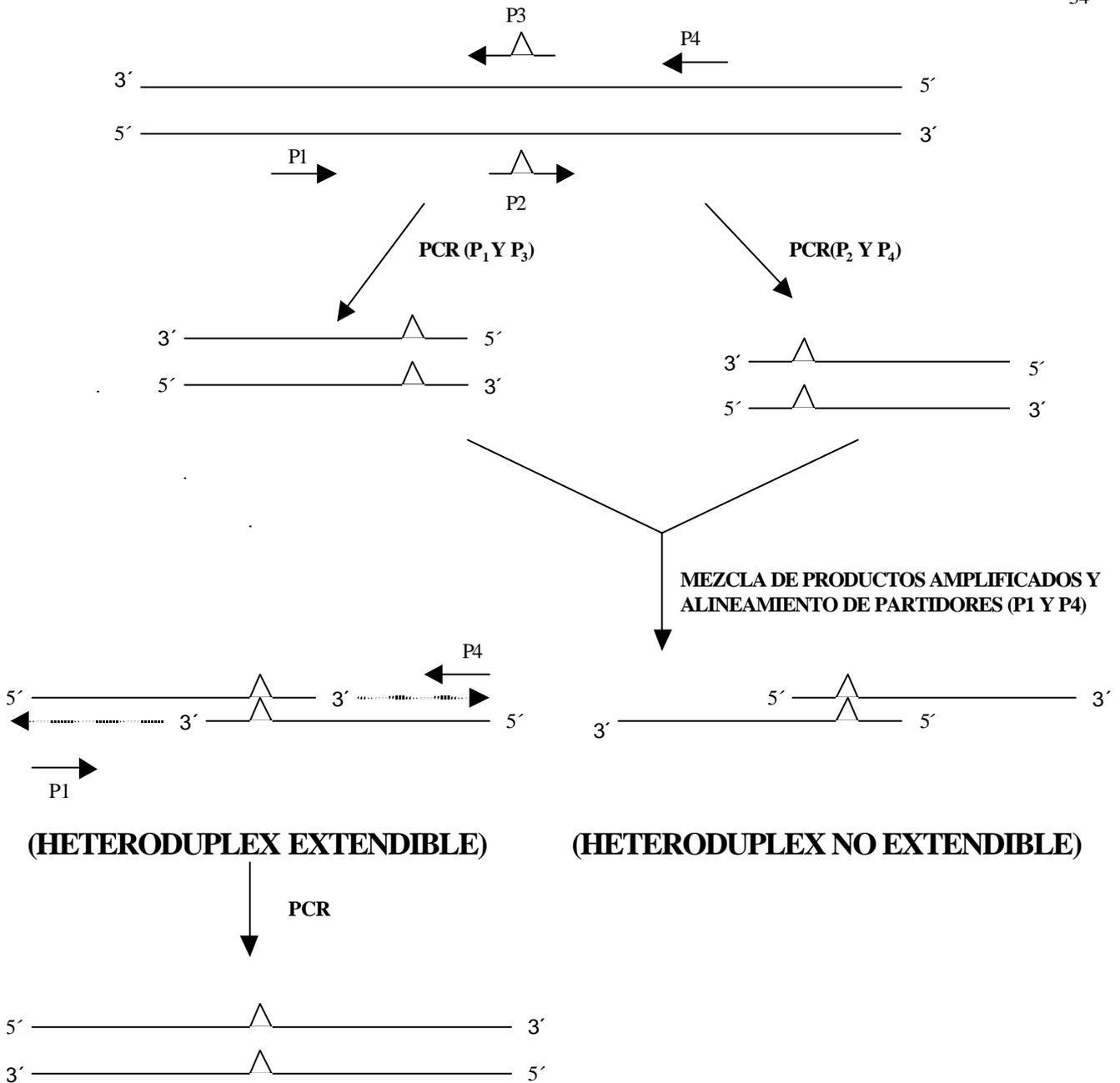
Los potenciales de reversión obtenidos de los registros de corriente fueron corregidos con respecto al potencial de unión líquida para cada anión evaluado. Los experimentos electrofisiológicos fueron repetidos a lo menos tres veces y los datos son entregados como el promedio  $\pm$  error estándar promedio y las diferencias fueron evaluadas por medio del test de Student's considerando como diferencias significativas un  $p < 0.05$  (\*) y (\*\*) indica un  $p < 0.01$ .

## 4. RESULTADOS

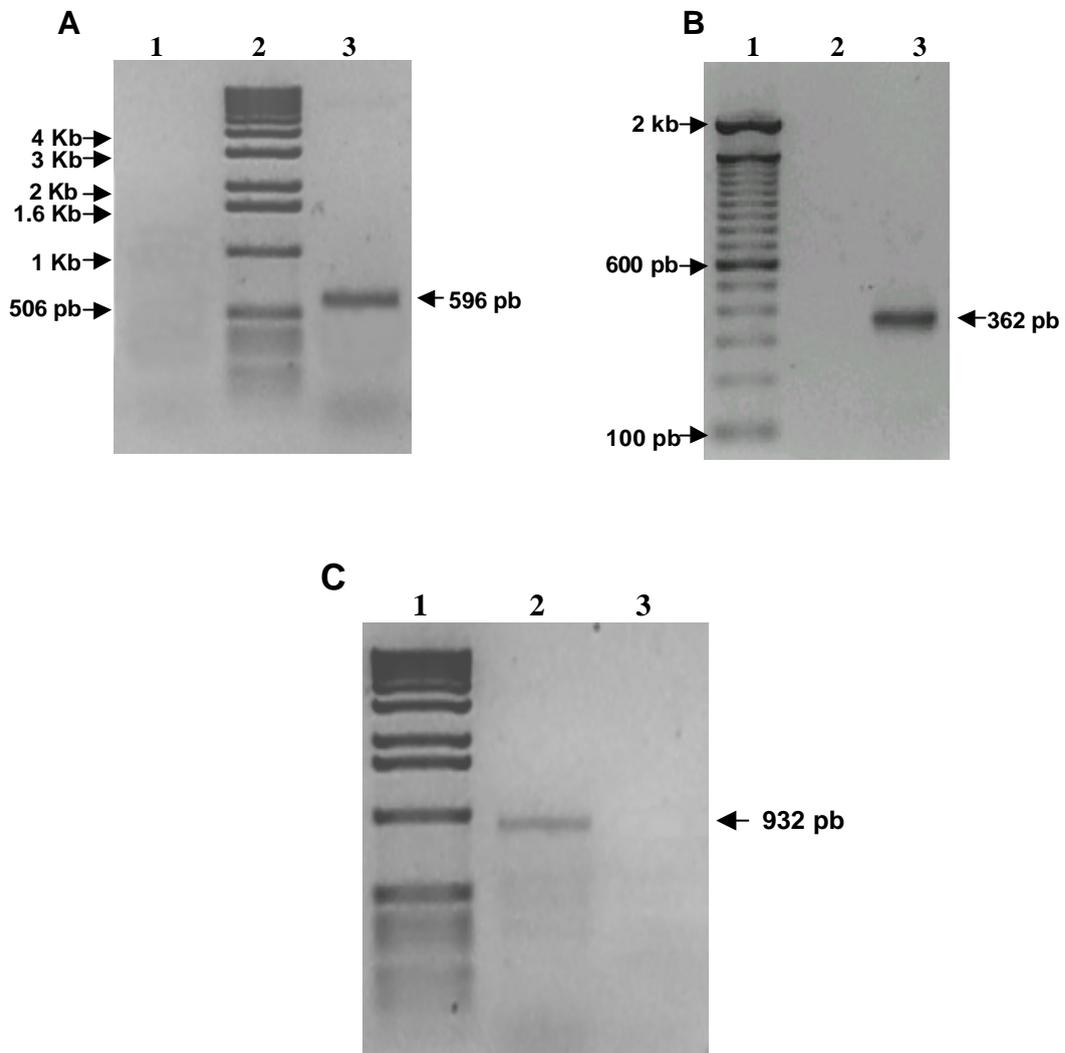
### 4.1 Mutagénesis sitio dirigida

Para la generación de la mutación sitio dirigida se utilizó un método basado en la polimerasa en cadena (PCR) esquematizado en la figura 9, con este fin se utilizaron los partidores mutagénicos sC256A y asC256A además de dos partidores no mutagénicos uno de ellos ubicado río arriba del sitio a mutar y en orientación sentido (AT-8) y otro en orientación antisentido ubicado río abajo (TRB-D8) en orientación antisentido, la figura 10 muestra el resultado de las reacciones de PCR, obteniéndose los productos de amplificación de los tamaños esperados. La figura 10A muestra el producto de amplificación por PCR usando los partidores AT-8 y AsC256A además del templado pCR3.2/rCIC-2 obteniéndose una banda de 596 pb, la figura 10B muestra el resultado de la PCR usado los partidores TRB-D8 y sC256A, además del templado pCR3.1/rCIC-2, dando un producto de amplificación de 362 pb. Una vez obtenido los productos de PCR deseados se realizó la extracción de estos productos del gel de agarosa. Luego de purificados se realizó una nueva PCR usando esta vez como templado los productos de PCR purificados (bandas de 596 pb y 362 pb) y los partidores AT-8 y TRB-D8, obteniéndose un producto de amplificación del tamaño de 932 pb lo que corresponde al tamaño esperado (figura 10C).

Los controles negativos de todas las reacciones de PCR realizadas se diferencian únicamente de la reacción experimental por la falta del templado correspondiente para cada caso, el que fue reemplazado por agua.



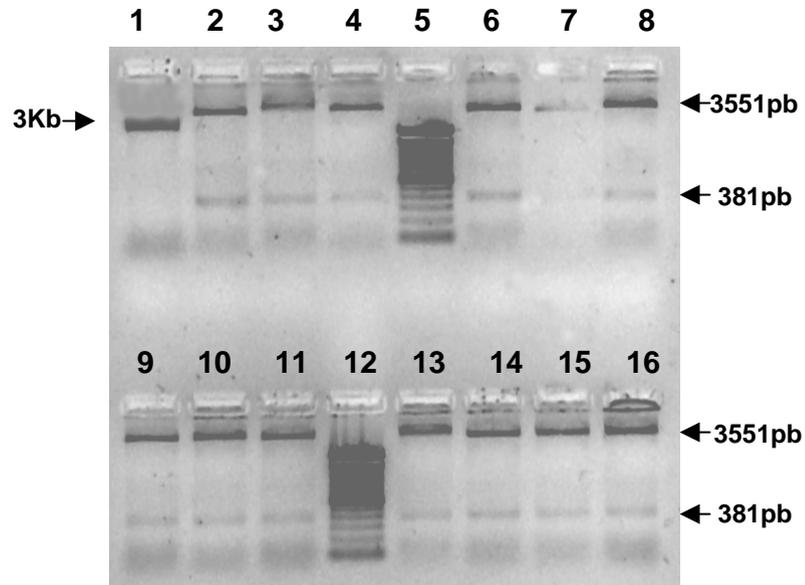
**Figura 9. Procedimiento esquemático para la generación mutaciones sitio dirigidas.** Método de mutagénesis basado en PCR de extensión por superposición (overlap-extension PCR).



**Figura 10. Productos de amplificación por PCR.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio **A)** carril 1, control negativo de la reacción de PCR; **carril 2**, estándar de peso molecular de 1 Kb; **carril 3**, producto de amplificación de 596 pb obtenido usando los partidores AT-8 y AsC256A. **B)** carril 1, estándar de peso molecular de 100 pb; **carril 2**, control negativo de la reacción de PCR; **carril 3**, producto de PCR de 362 pb obtenido usando los partidores sC256A y TRB-D8 **C)** carril 1, Estándar de peso molecular de 1 Kb; **carril 2**, producto de PCR de 932 pb obtenido a partir de los fragmentos generados (carriles 3 de las figuras **A** y **B**), como templado y los partidores AT-8 Y TRB-D8; **carril 3**, control negativo de la reacción de PCR.

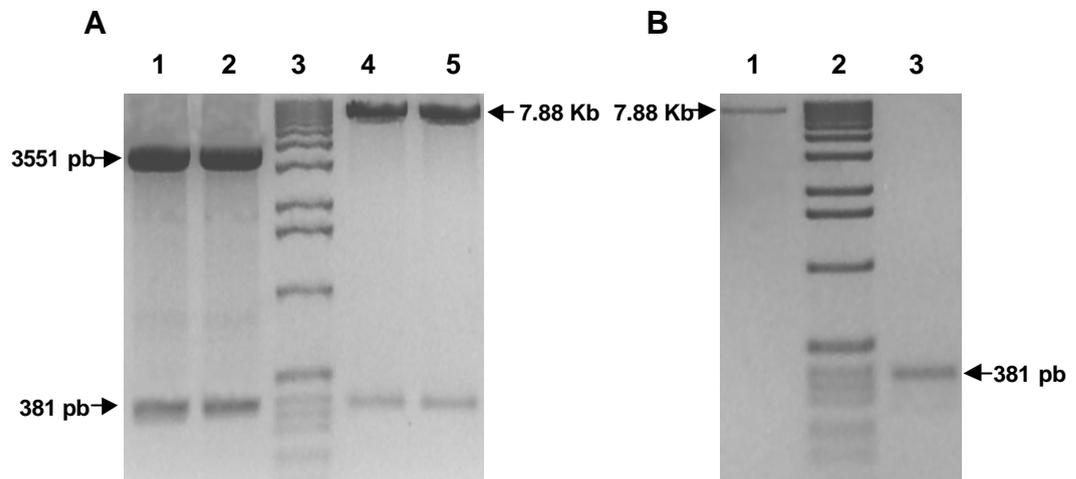
Una vez obtenido el producto de amplificación final (banda de 932 pb), se extrae del gel de agarosa y se realizó una reacción de ligación usando para ello el vector pGEM-T y la enzima T4 DNA ligasa (ver materiales y métodos), luego se transformaron bacterias competentes DH $\alpha$ -5, las que fueron sembradas en placas de agar con ampicilina como antibiótico de selección además de IPTG y X-Gal. De las colonias crecidas se seleccionaron las que presentaban una coloración blanca y se dejaron creciendo en medio líquido LB con ampicilina y posteriormente se realizó una extracción de DNA plasmidial de las bacterias seleccionadas y un análisis de restricción para comprobar la existencia del inserto de interés (producto de PCR final). La enzima utilizada para este fin fue la BstE II (Gibco; BRL), la cual presenta dos sitios de restricción en el inserto y cuya digestión genera un fragmento de 381 pb además de no presentar sitios de restricción en el vector pGEM-T.

El análisis de restricción del vector que ha incorporado el inserto debe mostrar la presencia de dos bandas correspondientes a una de 381 pb y de 3551 pb que corresponde al vector (3000 pb) más los 551 pb restantes del producto de PCR final, el análisis de restricción (figura 11) muestra los patrones de digestión de diferentes colonias bacterianas seleccionadas (carriles 2-4, 6-11 y 13-16), mostrando un patrón de digestión positivo, se indican las bandas y su correspondiente peso molecular, el carril 1 muestra el análisis de restricción de una colonia cuyo color azul indicaba la religación del vector y por tal motivo la no existencia de sitios de restricción para la enzima BstE II, por lo tanto sólo aparece una banda de alrededor de 3 Kb correspondiente al vector religado.



**Figura 11. Análisis de restricción DNA plasmidial extraído de células transformadas con la reacción de ligación del producto de PCR final y el vector pGEM-T.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, las digestiones fueron realizadas por una hora a 37 °C con la enzima BstE II; Carril 1, control negativo, DNA extraído de una colonia de bacterias transformadas con el vector pGEM-T religado, mostrando una banda correspondiente al vector sin digerir (~3 Kb) . Carril 5 y 12, estándar de peso molecular de 100 pb; Carril 1-4, 6-11 y 13-16 patrón de digestión del DNA extraído de células transformadas con la reacción de ligación mostrando una banda de 381 pb lo que confirma la ligación del producto de amplificación y el vector pGEM-T, además de la banda correspondiente al resto del vector de 3551 pb.

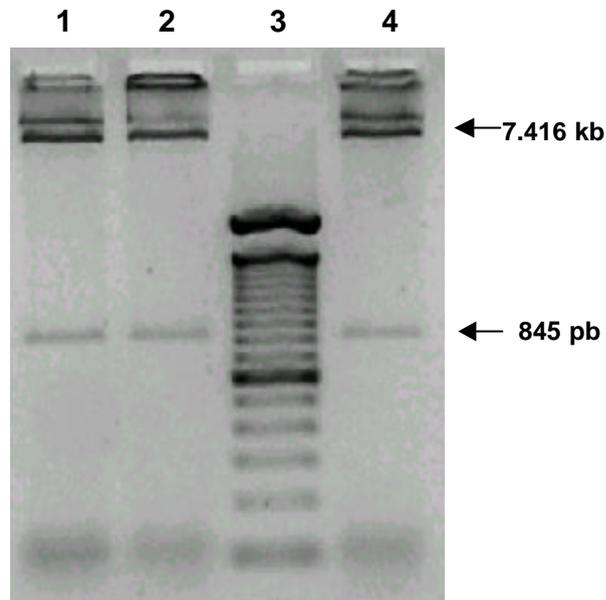
Luego de la confirmación de la existencia del inserto ligado en el vector pGEM-T, se seleccionó una de estas colonias, la número 2, se amplificó mediante un cultivo líquido y se purificó usando el sistema DNA Wizard plus midipreps, el DNA obtenido de esta forma fue sometido a una digestión con el objeto de extraer un fragmento de DNA correspondiente al rCIC-2, que incluya la mutación deseada con el fin de restablecer la secuencia completa del rCIC-2, mediante una reacción de ligación. En esta reacción se usó el pCR3.1/rCIC-2 previamente digerido y desfosforilado para impedir su religación. La figura 12A muestra el resultado de las digestiones tanto de pGEM-T/PCR como del pCR3.1/rCIC-2 con la enzima de restricción BstE II, las digestiones fueron realizadas por dos horas a 37 °C, usando 7 µg de DNA (pGEM-T/PCR) y 1 µg de DNA pCR3.1/rCIC-2, los carriles 1 y 2 muestran el resultado de la digestión de pGEM-T/PCR, indicando las bandas obtenidas de 381 pb y 3551 pb y los carriles 4 y 5 muestran el resultado de la digestión de pCR3.1/rCIC-2 indicando las bandas obtenidas de 381 pb y 7.88 Kb. Las bandas de 381 pb carril 1 y 2 así como las de 7.88 Kb carriles 4 y 5 fueron extraídas del gel de agarosa y utilizadas en una nueva reacción de ligación. La figura 12B muestra la corrida electroforética de unas alícuotas del producto de la extracción de las bandas de 381 pb y 7.88 Kb del gel mostrado en la figura 12A, lo que confirma el buen resultado de la extracción, además de permitir estimar la cantidad de DNA por medio de la intensidad de las bandas y con ello usar una proporción molar de (3:1) vector inserto en la reacción de ligación. La reacción de ligación para restablecer la secuencia del rCIC-2 fue realizada usando la enzima T4DNA ligasa, luego se transformó células competentes DH $\alpha$ -5 con una alícuota de esta reacción y luego sembradas en placas de agar con ampicilina.



**Figura 12. Análisis de restricción. A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de digestiones realizadas con la enzima BstE II, Carril 1 y 2 digestion de pGEM-T/PCR mostrando las bandas esperadas de 381 pb y 3.551 Kb; Carril 3 estándar de peso molecular de 1 Kb Carril 4 y 5 digestión del pCR3.1/rCIC-2 mostrando la bandas esperdas de 381 pb y 7.88 Kb **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del resultado de la extracción de DNA de agarosa, carril 1 extracción del DNA de interés (banda de 7.88 Kb carril 4 y 5 figura **A**) Carril 2 estándar de peso molecular de 1 kb, Carril 3 extracción de DNA de gel de agarosa (banda de 381 pb carril 1 y 2 figura **A**).

Una vez obtenidas las bacterias efectivamente transformadas se realizó una extracción del DNA plasmidial y un ensayo de restricción para confirmar el restablecimiento de la secuencia del rCIC-2. Además de confirmar que el inserto ha sido incorporado en orientación sentido, debido que los sitios de clonamiento utilizados son generados por una sola enzima, por lo tanto la ligación del inserto puede ser en orientación sentido como antisentido. Los resultados de este análisis son presentados en la figura 13 la que muestra el patrón de digestión de tres colonias diferentes carriles 1, 2 y 4 usando la enzima Nhe I, la digestión fue realizada por una hora a 37 °C, observándose las bandas esperadas para una ligación del inserto en orientación sentido, una banda de 845 pb y una banda de 7.416 Kb, si el inserto hubiese sido ligado en orientación antisentido las bandas obtenidas serían de 612 pb y 7.649 Kb.

Posteriormente se seleccionó una colonia bacteriana y se realizó un cultivo en medio LB líquido con ampicilina por 24 h y luego se purificó el DNA mediante el sistema DNA Wizard plus midipreps, la colonia seleccionada en este caso es la correspondiente al carril 2 de la figura 13. El DNA fue luego secuenciado para confirmar la presencia de la mutación.



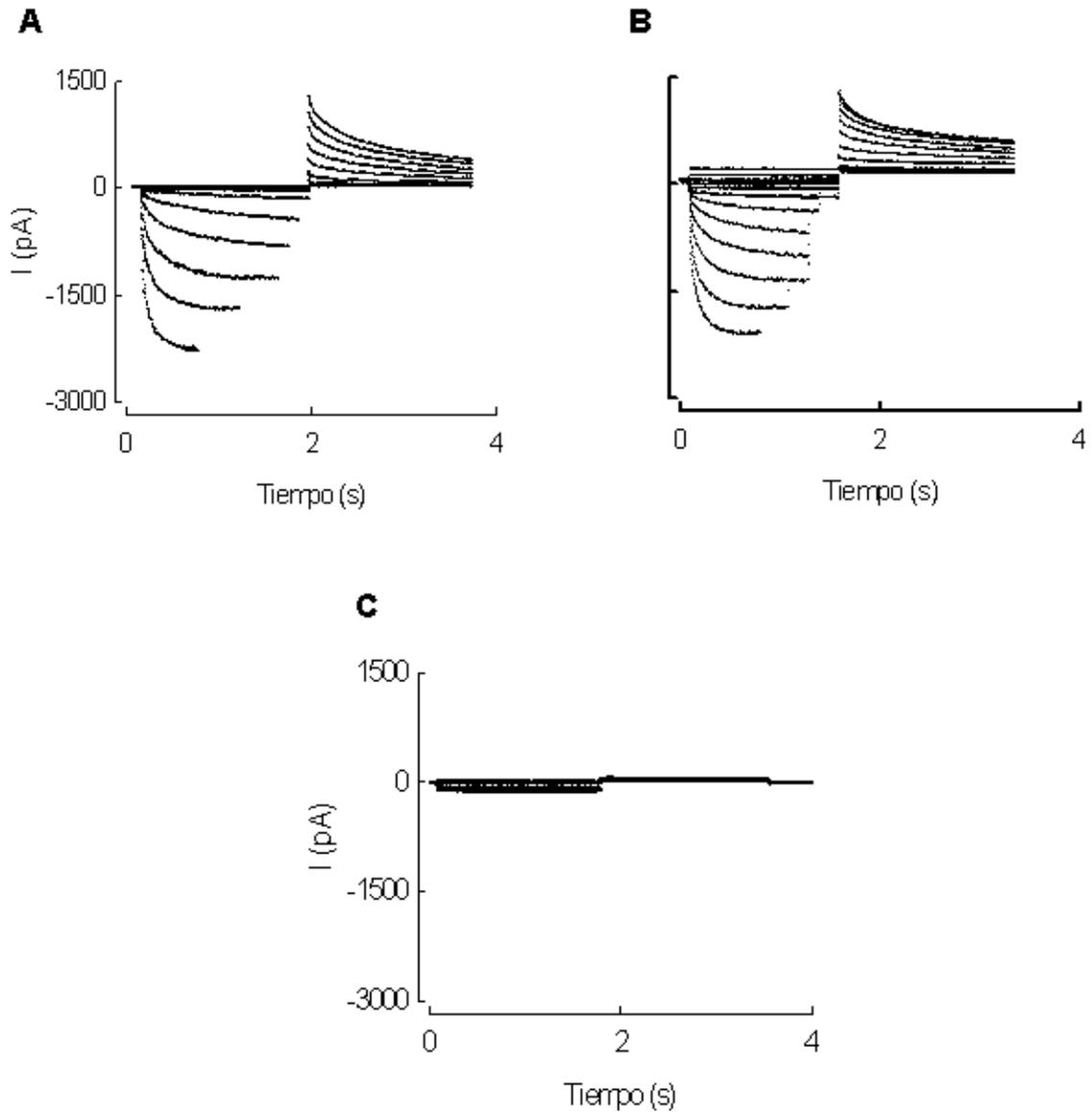
**Figura 13. Análisis de restricción de DNA plasmidial.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Digestión de DNA extraído de células transformadas con la reacción de ligación de los fragmentos de 381 pb (digestión de pGEM-T/PCR con BstE II) y 7.88 Kb (digestión de pCR3.1/rCIC-2 con BstE II). La digestión del DNA fue realizada con la enzima Nhe I por una hora a 37 °C, los carriles 1,2 y 4 muestran el resultado de la digestión de tres colonias bacterianas diferentes con un patrón de digestión positivo, mostrando las bandas esperadas de 845 pb y 7416 pb, el carril 3 muestra el estándar de peso molecular de 100 pb.

## 4.2 Expresión de canales en células transfectadas

El análisis funcional tanto del canal mutado rCIC-2C256A como del rCIC-2, fue llevado a cabo mediante el estudio electrofisiológico realizado por **Patch-Clamp** en su configuración de célula entera. Para ello se utilizó una concentración de cloruro en la pipeta de 35 mM y en el baño una concentración de cloruro 140 mM. En la figura 14A se muestra un registro de corrientes obtenido de células HEK-293 transfectadas con el constructo pCR3.1/rCIC-2 y este registro presenta un patrón de corrientes esperado para rCIC-2, en el cual se puede apreciar un aumento de la corriente a potenciales de membrana hiperpolarizantes, de igual forma a lo que ocurre en 14B cuya figura corresponde a un registro de corrientes en células HEK-293 transfectadas con el constructo pCR3.1/rCIC-2C256A cuya expresión corresponde al mutante rCIC-2C256A. El aumento de la corriente a potenciales hiperpolarizantes corresponde a lo descrito anteriormente en diferentes estudios realizados en rCIC-2.

Las corrientes endógenas obtenidas de células HEK-293 sin transfectar es presentado en la figura 14C, donde se aprecia la baja actividad de canales iónicos nativos, lo que las hace un muy buen sistema para la expresión heteróloga de canales.

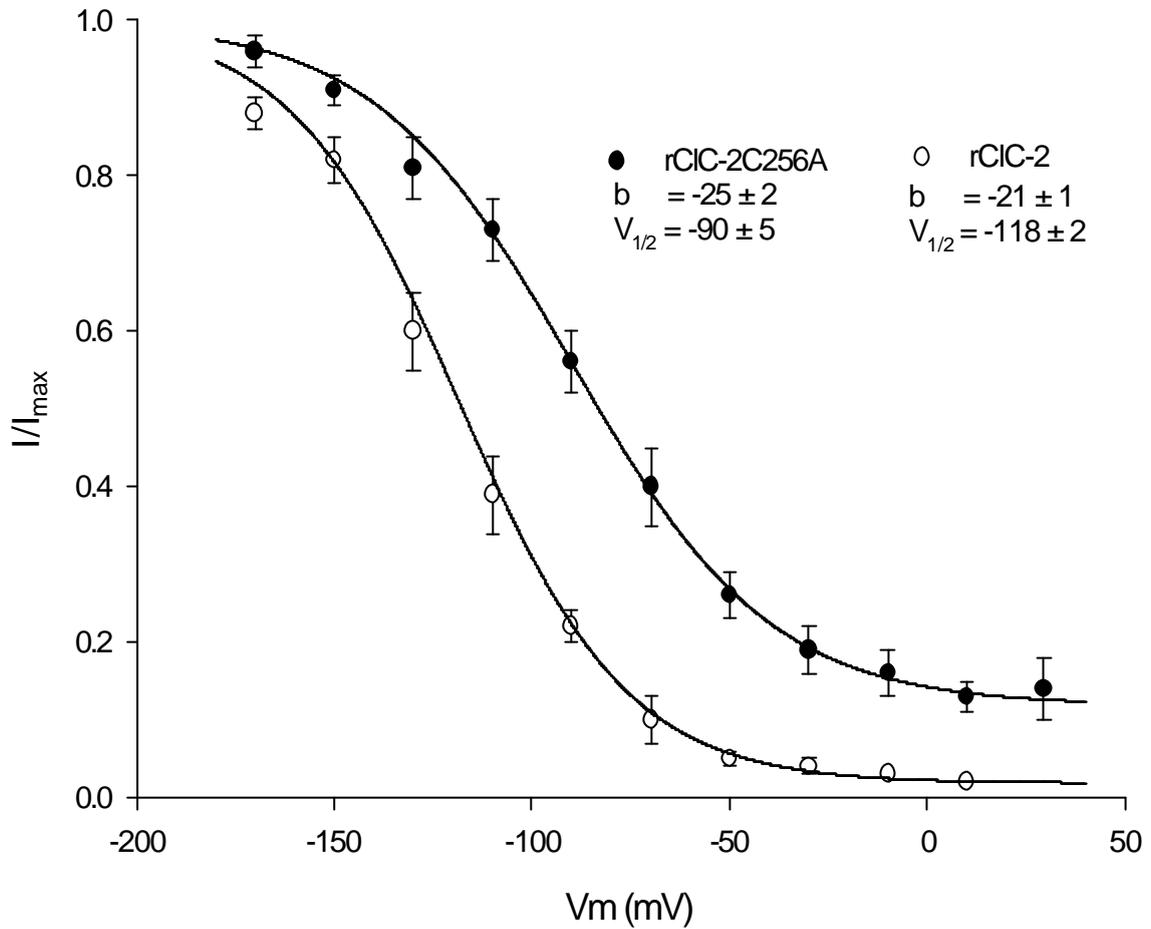
El protocolo de pulsos utilizado va desde +40 mV hasta -180 mV en pasos de 20 mV, y son de duración variable hasta lograr saturación. Éstos van seguidos de un pulso a +40 mV con el objeto de estudiar la cinética de cierre del canal, de esta forma los canales son activados inicialmente y luego mediante el pulso a +40 mV son cerrados rápidamente. Como el cambio de potencial es rápido, el registro de corriente obtenido a este potencial, corresponde al cierre de los canales que fueron abiertos durante el



**Figura 14. Expresión de canales en células HEK-293 transfectadas. A)** Corrientes registradas en células transfectadas con pCR3.1/rCIC-2. **B)** Corrientes registradas en células transfectadas con pCR3.1/rCIC-2C256A. **C)** Registro de corrientes obtenidas en células sin transfectar. Las corrientes fueron obtenidas usando un protocolo de pulsos de largo variable hasta lograr saturación desde +40 mV a -180 mV en pasos de 20 mV seguidos de un pulso a +40 mV.

pulso hiperpolarizante, lo que representa la cinética de cierre de estos canales. Una vez evaluada la expresión de los canales iónicos, se estudió la dependencia de voltaje de la activación. Para este fin se cuantificó las amplitudes de las corrientes de cola. Esta corresponde a la corriente a tiempo cero, después de la activación a 40 mV. La así obtenida dependencia de voltaje fue ajustada a una distribución de Boltzmann.

La figura 15 muestra gráficos en que se ha tomado los promedios de varios experimentos luego de normalizar a la corriente máxima deducida de los valores del ajuste. La dependencia de potencial tanto para rCIC-2 como para rCIC-2C256A se presentan en el mismo gráfico, indicándose los parámetros obtenidos en el ajuste de Boltzmann. Para rCIC-2C256A el  $V_{1/2}$  tiene un valor de  $-90 \pm 5$  y el valor de  $b$  de  $-25 \pm 2$  y para rCIC-2 el  $V_{1/2}$  es de  $-118 \pm 2$  con  $b$  igual a  $-21 \pm 1$  ( $n=5$ ). Estos resultados indican que en cuanto a la dependencia de potencial rCIC-2C256A presenta un desplazamiento del  $V_{1/2}$  de alrededor de 30 mV hacia potenciales más depolarizados, lo que significa que se encuentra en un estado conductivo a potenciales menos hiperpolarizantes, además se hace visible un aumento en la conductancia mínima lo que se refleja en el pie de actividad remanente a potenciales positivos. Estos cambios se evidencian incluso en las trazas de corrientes obtenidas (figura 14), en donde se observa actividad a potenciales positivos.



**Figura 15. Dependencia de voltaje de la activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A.** Las corrientes de cola, registradas a +40 mV inmediatamente después del protocolo de pulsos, fueron ajustadas a una distribución de Boltzmann para obtener el  $V_{1/2}$ ,  $I_{\max}$ ,  $b$  y la pendiente  $b$ . Las corrientes fueron normalizadas con respecto al  $I_{\max}$  y graficadas en función del voltaje aplicado. El gráfico muestra los resultados obtenidos para rCIC-2 (círculos blancos) y para rCIC-2C256A (círculos negros).

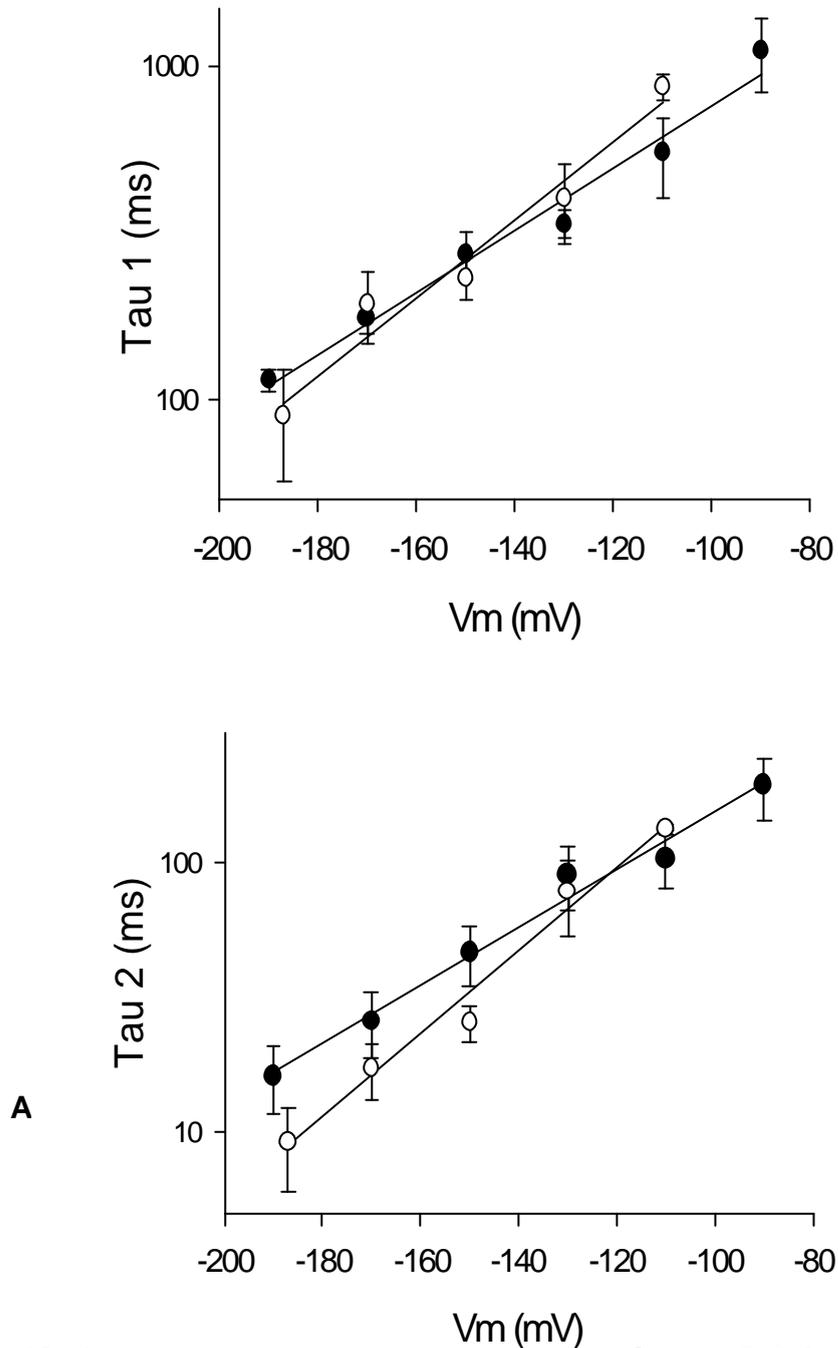
## 4.3 Propiedades de compuerta

### 4.3.1 Cinética de activación

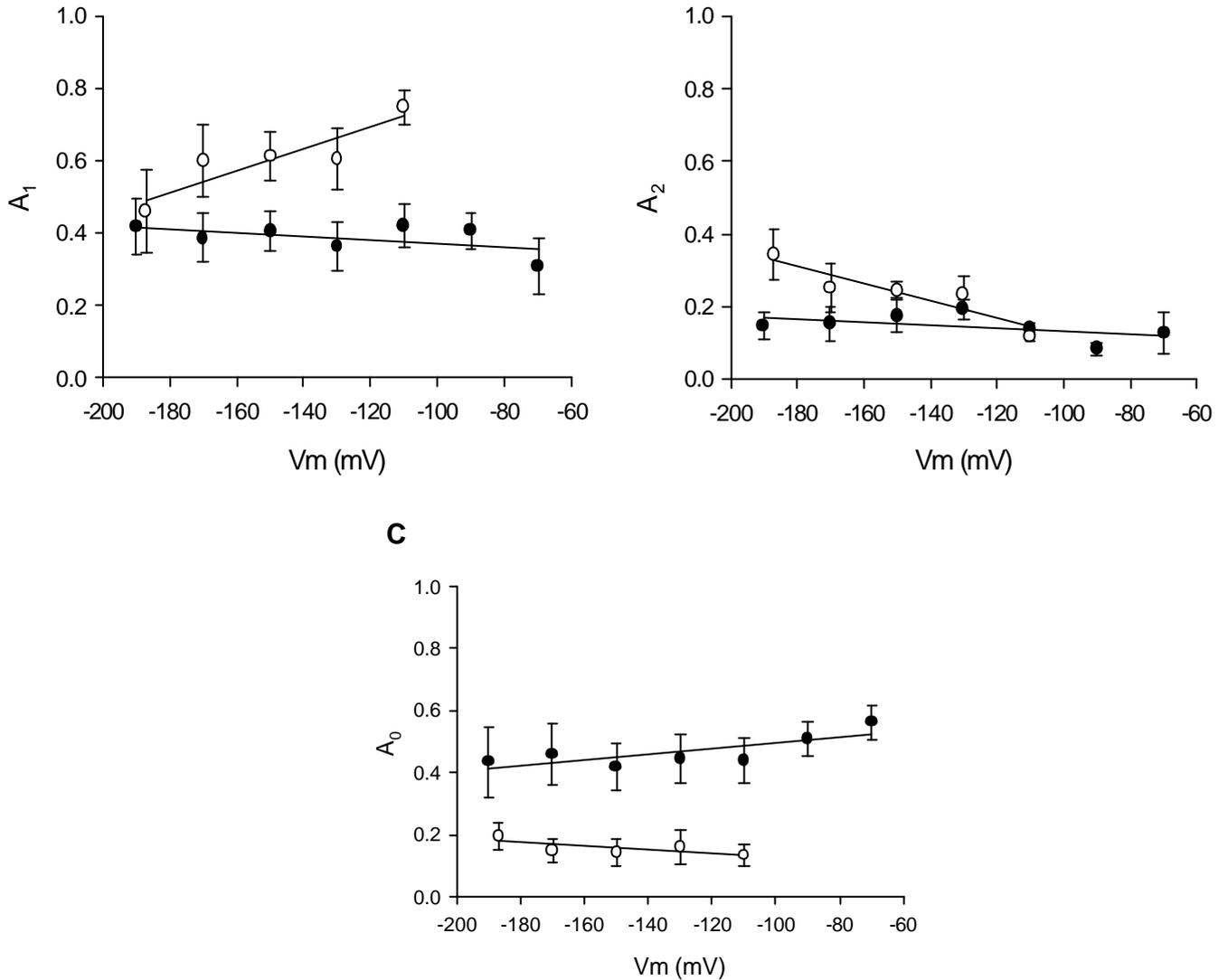
Para estudiar el efecto de la mutación C256A sobre el mecanismo de compuerta, se realizó un análisis de la dependencia de tiempo de la activación del canal, mediante el ajuste de las corrientes de activación obtenidas para cada pulso evaluado a una función exponencial doble (ver materiales y métodos), el protocolo de pulsos usado para ello es similar al descrito para la figura 14.

Las activaciones pueden ajustarse a un modelo exponencial doble, en el que se requiere de una fracción muy rápida, que se representa por un componente instantáneo, y dos relajaciones una lenta y otra rápida. Las constantes de tiempo ( $\tau_1$ = constante de tiempo lenta y  $\tau_2$ = constante de tiempo rápida) obtenidas mediante este ajuste son luego graficadas en función del potencial aplicado lo que es presentado en la figura 16, observándose que ambas constantes mantienen su dependencia de potencial, con un aumento en la rapidez a potenciales de membrana hiperpolarizantes tanto en el rCIC-2 no mutado como en rCIC-2C256A.

Además, se comparó las fracciones de amplitud obtenidas para cada componente lo que es presentado en la figura 17, estas fracciones corresponden al peso de cada componente descrito en las corrientes de activación, siendo  $A_0$  la fracción correspondiente al componente instantáneo,  $A_1$  la fracción correspondiente al componente lento y  $A_2$  la fracción del componente rápido.



**Figura 16. Dependencia de tiempo de la activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A. A y B.** Constantes de tiempo tiempo lenta (Tau 1) y rápida (Tau 2), respectivamente, en función de los diferentes potenciales de membrana evaluados. Las constantes de tiempo fueron obtenidas del ajuste de las corrientes de activación a una función exponencial doble. Círculos negros rCIC-2C256A y blancos rCIC-2.



**Figura 17. Fracciones de amplitud de activación de rCIC-2 y rCIC-2C256A. A, B y C.** Fracciones de amplitud obtenidas del ajuste de las corrientes de activación a una función exponencial doble.  $A_0$  representa el peso del componente instantáneo en la corriente total,  $A_1$  el del componente lento (Tau 1) y  $A_2$  el del componente rápido (Tau 2). Las fracciones son representadas en función de los diferentes potenciales de membrana evaluados. Círculos negros rCIC-2C256A y blancos rCIC-2.

Estas fracciones permiten cuantificar la importancia de cada componente en la corriente total. El efecto de mayor importancia aparente de la mutación C256A fue un importante aumento de  $A_0$  a todos los potenciales estudiados. Esta fracción considerada instantánea es pequeña en CIC-2 pero alcanza a más de un 40-50 % del total como consecuencia de la mutación C256A. Las fracciones de amplitud obtenidas para rCIC-2C256A muestran una pérdida de la dependencia de potencial. Además en el caso del componente instantáneo éste presentó un aumento del doble con respecto a la fracción obtenida para el rCIC-2, pasando desde 0.2 a 0.4. Esta variación es debido al incremento en la probabilidad mínima de apertura.

La fracción  $A_1$  presenta además una disminución con respecto a la obtenida para rCIC-2, esta diferencia se hace mucho más evidente a potenciales menos hiperpolarizantes (-170 mV a -100 mV). En cuanto a la fracción  $A_2$  esta presenta diferencias sólo a potenciales hiperpolarizantes sobre -180 mV, siendo muy poco afectada por esta mutación.

#### **4.3.2 Cinética de cierre**

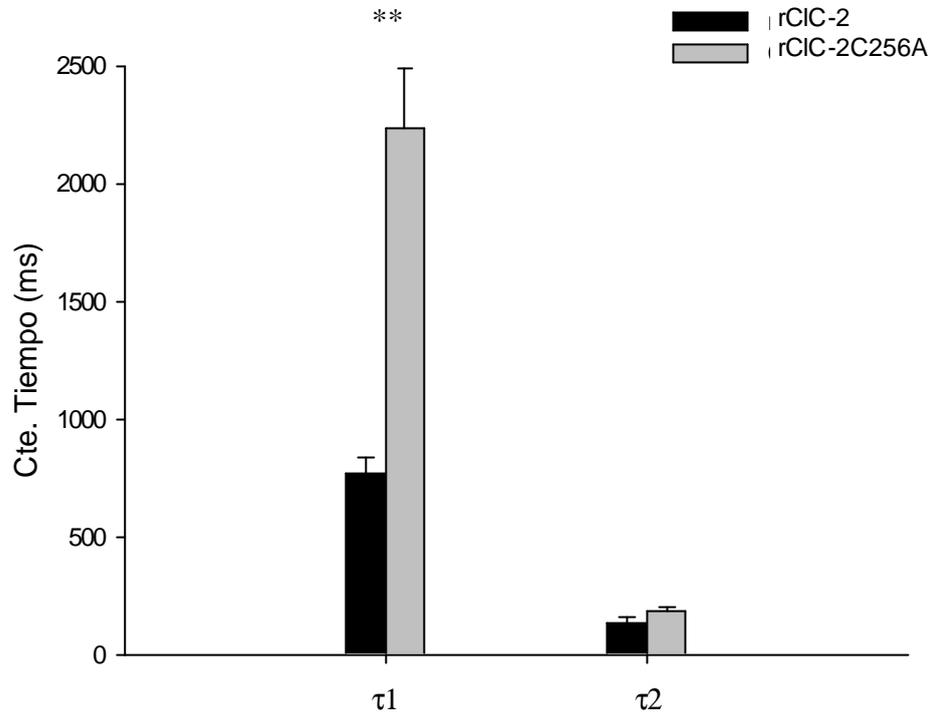
Una vez realizado el estudio de la cinética de activación, se realizó el estudio de la cinética de cierre, para este fin se obtuvieron registros de corriente usando un protocolo de pulsos en el cual se aplicó un potencial de membrana de -120 mV de duración variable hasta lograr una apertura a un estado estacionario aparente, con el objeto de activar los canales. Luego se cambió el potencial de membrana a +40 mV, lo que genera el cierre de una parte de los canales abiertos. La relajación obtenida

durante el pulso de +40 mV corresponde al cierre de los canales abiertos durante el prepulso. Por lo tanto el decaimiento de la corriente de cola corresponde a la cinética de cierre que presentan estos canales.

El estudio de la cinética de cierre se realizó mediante el ajuste de las corrientes de cola a una función exponencial doble (ver materiales y métodos), la figura 18 muestra el resultado de dicho ajuste mediante un gráfico de barras en el que se compara las constantes de tiempo obtenidas para rCIC-2C256A y rCIC-2, presentando diferencias altamente significativas para las constantes de tiempo lentas  $\tau_1$ , en el caso de rCIC-2C256A ésta fue aumentada alrededor dos veces con respecto a la constante determinada para rCIC-2. Este aumento significa que el componente lento de rCIC-2C256A es mucho más lento en comparación al obtenido para el canal tipo silvestre.

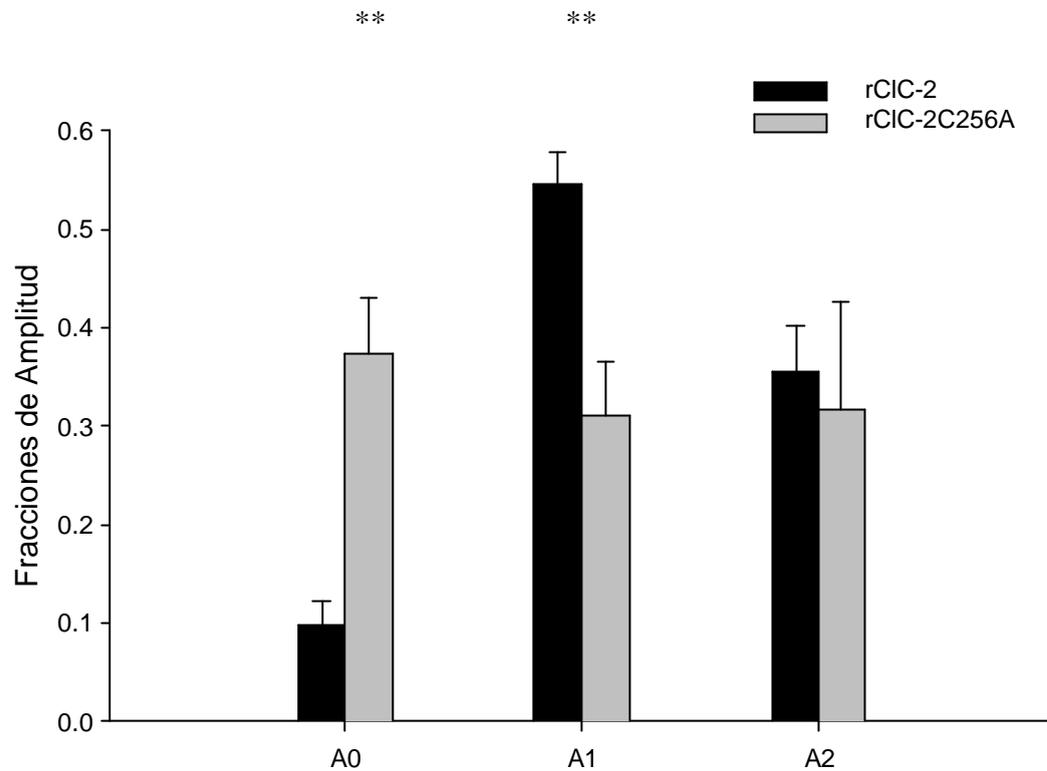
En relación a la constante de tiempo rápida  $\tau_2$  esta no muestra diferencias significativas con respecto a la constante determinada para rCIC-2.

De igual forma que en la activación se estudió el efecto de la mutación sobre las fracciones de amplitud obtenidas para la cinética de cierre (figura 19). En esta figura se muestra un gráfico de barras comparando las fracciones de amplitud obtenidas para rCIC-2C256A y rCIC-2.  $A_0$  representa la fracción de actividad remanente extrapolable a tiempo infinito. Ésta es pequeña para rCIC-2 pero está significativamente aumentada en la mutante. Esto revela que para rCIC-2C256A los canales no experimentan un cierre total con aproximadamente un 35 % de actividad inicial que no decae.



**Figura 18. Constantes de tiempo de deactivación de rCIC-2 y rCIC-2C256A.**

Constantes de tiempo obtenidas del ajuste a una función exponencial doble de las corrientes de cola. Las corrientes fueron registradas a +40 mV tras un pulso de activación a -120 mV. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de 5 y 11 experimentos para rCIC-2C256A y rCIC-2 respectivamente, encontrándose diferencias significativas solo para  $\tau_1$ .



**Figura 19. Fracciones de amplitud de deactivación.** Fracciones de amplitud obtenidas del ajuste a una función exponencial doble de las corrientes de cola. Las corrientes fueron registradas a +40 mV tras un pulso de activación a -120 mV. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de 5 y 11 experimentos para rCIC-2C256A y rCIC-2 respectivamente, el análisis estadístico muestra diferencias significativas en la fracción  $A_0$  y  $A_1$ .

El aumento de  $A_0$  fue a expensas principalmente de la componente más lenta del cierre (A1). En rCIC-2C256A esta disminución del cierre lento, tanto en contribución a la desactivación como a su enlentecimiento es concordante con los resultados obtenidos para las mutaciones homólogas en CIC-0 y 1.

Estos resultados demuestran que el componente lento del mecanismo de cierre es el que presenta una mayor importancia en dicho proceso y su alteración provoca que el canal se mantenga en una conformación abierta (conductiva).

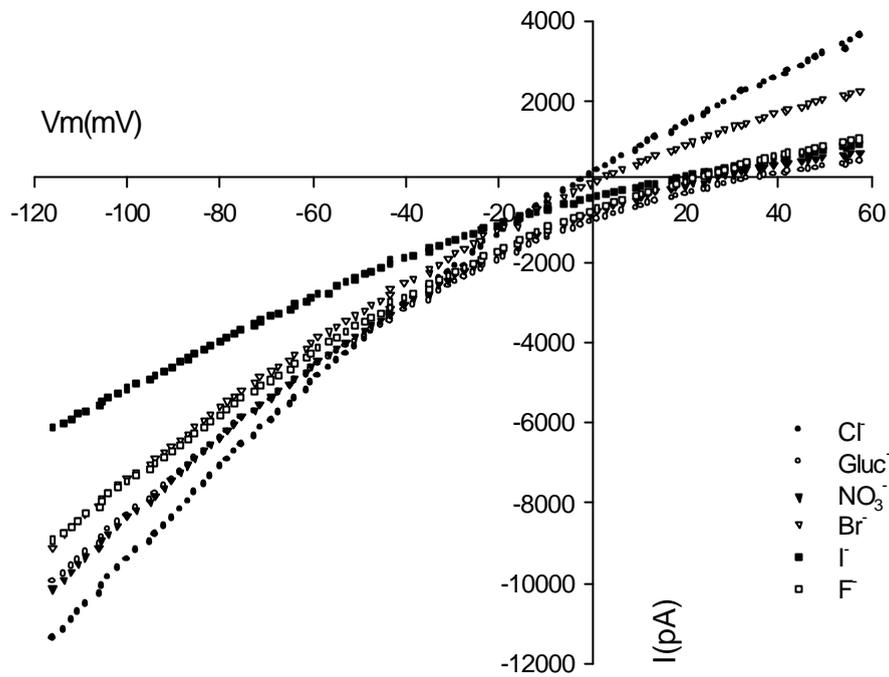
#### **4.4 Estudio de la selectividad**

Para descartar algún efecto de la mutación sobre las propiedades de poro se realizó un análisis de la selectividad rCIC-2C256A y se comparó con la selectividad obtenida para rCIC-2.

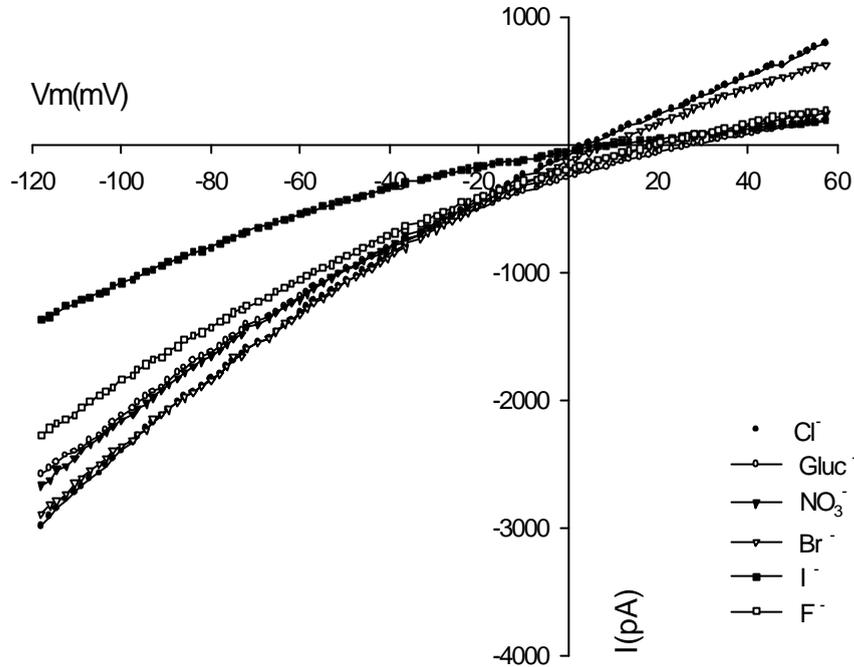
La selectividad aniónica fue determinada por medio de la medición del potencial de inversión de signo de la corriente  $E_{rev}$  en condiciones de soluciones externas, en las que el  $Cl^-$  fue reemplazado parcialmente por los aniones  $Gluc^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $F^-$ . El cálculo de la razón de permeabilidad  $P_X/P_{Cl}$  derivado de la ecuación de Goldman-Hodkin-Katz (ver materiales y métodos).

Las figuras 20 y 21 muestran las curvas I-V de las corrientes instantáneas, obtenidas para cada anión evaluado usando para ello una rampa de rápida depolarización desde un potencial de  $-120$  mV a  $+40$  mV en 200 ms para rCIC-2 y rCIC-2C256A respectivamente.

El análisis de estas curvas I-V, permitió la obtención de los potenciales de inversión para cada anión evaluado, los resultados se muestran en la tabla 1, ésta no muestra cambios producto de la mutación realizada, igual resultado se obtuvo al comparar las razones de permeabilidad obtenidas para el canal mutado, lo que es presentado en la tabla 2, en esta tabla se puede apreciar que la secuencia de permeabilidad tanto para rCIC-2C256A como para rCIC-2 es del siguiente orden  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- \cong \text{NO}_3^- \cong \text{F}^- > \text{Gluc}^-$  lo que confirma que la mutación no afecta las propiedades de poro.



**Figura 20. Selectividad aniónica de rCIC-2.** Curva corriente voltaje obtenida a partir de corrientes instantáneas activadas por una rampa de voltaje de rápida depolarización desde potenciales de -120 mV a +40 mV en 200 ms y registradas usando concentraciones simétricas de alto Cloruro o reemplazos parciales de Cloruro por los aniones Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), Bromuro ( $\text{Br}^-$ ), Yoduro ( $\text{I}^-$ ), Fluoruro ( $\text{F}^-$ ) y Gluconato ( $\text{Gluc}^-$ ).



**Figura 21. Selectividad aniónica de rCIC-2C256A.** Curva corriente voltaje obtenida a partir de corrientes instantáneas activadas por una rampa de voltaje de rápida depolarización desde potenciales de -120 mV a +40 mV en 200 ms y registradas usando concentraciones simétricas de alto Cloruro o reemplazos parciales de Cloruro por los aniones Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), Bromuro ( $\text{Br}^-$ ), Yoduro (I), Fluoruro ( $\text{F}^-$ ) y Gluconato ( $\text{Gluc}^-$ ).

**Tabla 1. Potenciales de reversión( $E_{rev}$ ) medidos para rCIC-2 y rCIC-2C256A**

	$Cl^-$	$Br^-$	$I^-$	$NO_3^-$	$F^-$	$Gluc^-$
<b>C256A</b>	1.5±1.4 (n=4)	5.7±1.3 (n=4)	14.5±5.1 (n=4)	18.9±2.5 (n=4)	21.9±3.3 (n=3)	24.9±2.3 (n=4)
<b>rCIC-2</b>	1.6±1.2 (n=6)	6.6±1.6 (n=6)	20.5±3.3 (n=6)	23.6±1.2 (n=6)	22.4±2.0 (n=3)	31.9±1.4 (n=6)

Potenciales de reversión obtenidos para cada anión evaluado, los resultados se presentan como promedio±error estándar, además se indica el número de experimentos realizados.

**Tabla 2. Razón de permeabilidad para rCIC-2 y rCIC-2C256A**

$P_X/P_{Cl}$						
	$Cl^-$	$Br^-$	$I^-$	$NO_3^-$	$F^-$	$Gluc^-$
<b>C256A</b>	1	0.83±0.01	0.58±0.13	0.45±0.04	0.40±0.08	0.33±0.03
<b>rCIC-2</b>	1	0.80±0.03	0.43±0.06	0.36±0.02	0.34±0.03	0.22±0.02

Razón de permeabilidad obtenida para cada anión evaluado, los resultados se presentan como promedio±error estándar y no muestran variaciones con respecto a la secuencia de permeabilidad.

## 5. DISCUSIÓN

La familia de canales CIC ha demostrado su implicancia en diversas enfermedades que resultan de mutaciones en alguno de sus miembros o por modelos knock-out en ratones (Koch *et al.*, 1992); (Lloyd *et al.*, 1996); (Simon *et al.*, 1997); (Kornak *et al.*, 2001). Por tal motivo se hace necesario el estudio y entendimiento de los mecanismos que controlan la apertura y cierre de estos canales con el objeto de diseñar o buscar estructuras químicas que puedan afectar su actividad y con ello remediar estas patologías.

La primera rama de esta familia a la que pertenece CIC-2 presenta alrededor de un 50% de identidad entre sus miembros (CIC-0, CIC-1 Y CIC-2) (ver figura 1) y solamente son expresados en la membrana plasmática. No obstante el alto grado de identidad, presentan diferencias significativas como por ejemplo CIC-0 cuenta con dos compuertas distinguibles entre sí. Una es la compuerta lenta que es activada a potenciales de membrana hiperpolarizantes y una compuerta rápida que es abierta a potenciales depolarizantes, además de permitir el estudio de canal único. Mediante este tipo de estudios, se estableció que este canal actúa en forma de dímero y se postuló el modelo de doble cañón (Miller, 1982) (figura 6).

En cuanto a CIC-1 este es el canal que se expresa en mayor cantidad en tejido muscular y es activado a potenciales depolarizantes. Presenta mecanismos de compuerta que son indistinguibles entre sí en corrientes macroscópicas, sin embargo estudios de canal único han demostrado que también se ajusta al modelo de doble cañón (Saviane *et al.*, 1999).

El tercer integrante de esta rama, CIC-2 presenta una expresión ubicua y su activación es generada a potenciales de membrana hiperpolarizantes (Thiemann *et al.*, 1992), presentando muy baja conductancia unitaria lo que hace difícil el estudio de canal único. Esto ha dificultado el estudio de los mecanismos de compuerta, impidiendo el desarrollo de un modelo cinético para este canal. Sin embargo por analogía dado el alto grado de identidad que presentan, se ha postulado que el modelo de doble cañón se ajustaría para los canales de la familia CIC y en un mayor grado a los canales de la primera rama.

De esta forma se hace importante la identificación de las compuertas, con el fin de confirmar este modelo o postular uno nuevo que de cuenta de los procesos asociados a la cinética. Con éste fin mediante las técnicas de biología molecular como mutagénesis sitio dirigida se ha logrado identificar en ciertos casos las compuertas propuestas. Tal es el caso de la mutación del residuo aminoácido C212 de CIC-0 (Lin & Chen, 2000) y C277 de CIC-1 (Accardi *et al.*, 2001), en ambos canales esta mutación generó una fuerte reducción del componente lento (compuerta lenta) del mecanismo de compuerta, lo que involucraría a este aminoácido en este mecanismo y además de permitir identificar la compuerta mediante estudios de corrientes macroscópicas.

En el canal CIC-2 la mutación en el residuo homólogo a los anteriormente mencionados la cisteína 256 por alanina fue generada utilizando un protocolo, el cual se basa en la reacción de la polimerasa en cadena PCR (Ho *et al.*, 1989).

El análisis funcional realizado mediante **patch-clamp**, mostró que el rCIC-2C256A mantiene las características similares a las de rCIC-2, lo que permite suponer

que la integridad estructural se mantuvo. Además, permitió el estudio de la dependencia de potencial, propiedades de poro, cinética de apertura y de cierre. Los resultados obtenidos muestran alteraciones significativas en los parámetros evaluados (ver figura 15), presentando un cambio en el  $V_{1/2}$  de alrededor de 30 mV hacia potenciales menos hiperpolarizantes, además de evidenciar un aumento en la probabilidad mínima de apertura. En cuanto a la cinética de apertura la dependencia de potencial de las constantes de tiempo tanto lenta como rápida no presentan variaciones con respecto a las obtenidas para rCIC-2, sin embargo existen diferencias con respecto al peso de cada componente en la corriente total perdiendo además la dependencia de potencial de estas fracciones de amplitud. Se observó también un aumento en el componente instantáneo lo que es esperable considerando el aumento en la probabilidad mínima de apertura.

El análisis de la cinética de cierre mostró un efecto visible en la mayoría de los registros obtenidos, en donde las trazas de corrientes de cola tras un pulso de depolarización a +40 mV no alcanzan a llegar a un estado inicial no conductivo tras un periodo de tiempo de 2 s, a diferencia de lo que ocurre en el rCIC-2, el que en su mayoría lo alcanza en un periodo de tiempo igual.

Un análisis más detallado muestra que está alterado el mecanismo de cierre del componente lento en rCIC-2C256A. Lo que se ve reflejado en el aumento de la constante de tiempo con respecto a la tau obtenida para rCIC-2 (ver figura 17), sin alterar el cierre de los componentes rápidos. De igual forma que en la cinética de activación se observó un aumento del componente instantáneo, en una proporción mayor a la observada en la activación. Esto es debido a que además del aumento de la

probabilidad de apertura observada en la activación se debe considerar el enlentecimiento del cierre de la compuerta lenta, lo que también se ve reflejado en el aumento del componente instantáneo.

La alteración de la cinética de cierre, que se manifiesta en un enlentecimiento del componente lento, puede ser debido a una estabilización de esta compuerta en un estado abierto, lo que concuerda con lo observado para CIC-0 y 1. En rCIC-2 una explicación sería un cambio en la dependencia de potencial de esta compuerta, por tal motivo al estudiar la cinética de cierre a +40 mV no es visible debido al cambio en su dependencia a diferencia de rCIC-2 en el que el cierre de la compuerta lenta es visible a este potencial.

Este efecto producto de la mutación C256A sugiere que rCIC-2 presenta una compuerta lenta, la que es afectada y que correspondería a la compuerta común descrita para CIC-0 y CIC-1, siendo por tal motivo el modelo de doble cañón propuesto aplicable para rCIC-2.

Además este efecto, sólo es en uno de los componentes que describen el mecanismo de compuerta en corrientes macroscópicas. Lo que concuerda con el resultado obtenido para CIC-0 en el que sólo se ve afectado uno de los mecanismos de compuerta, sugiriendo que no están acoplados, a diferencia de lo que ocurre en CIC-1 que la mutación si bien afecta en un grado mucho mayor la compuerta lenta también se ve afectada la compuerta rápida, lo que implicaría algún grado de acoplamiento entre estos mecanismos.

El efecto observado producto de la mutación es un efecto exclusivamente sobre el mecanismo de compuerta, debido a que las propiedades de poro se mantienen (tabla

1 y 2), presentando ambos canales una secuencia de permeabilidad del siguiente tipo  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- \cong \text{NO}_3^- \cong \text{F}^- > \text{Gluc}^-$ .

Finalmente, el resultado obtenido puede ser explicado cinéticamente con una disminución de la constante de velocidad  $\mu$  (ver figura 6) o bien de un aumento en  $\lambda$ , lo que produce un desplazamiento del equilibrio hacia los estados de compuerta lenta abierta.

Este trabajo evidencia la existencia de una compuerta lenta homologable a la compuerta común descrita para CIC-0 y CIC-1, siendo por tal motivo el modelo de doble cañón aplicable en parte para rCIC-2. Además, se comprobó que el residuo aminoácido cisteína 256 está involucrado en el mecanismo de compuerta del rCIC-2.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Accardi, A., Ferrera, L., & Pusch, M. (2001). Drastic reduction of the slow gate of human muscle chloride channel (ClC-1) by mutation C277S. *J.Physiol* 534, 745-752.

Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E., & Bear, C. E. (2000). Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem.J.* 352 Pt 3, 789-794.

Arreola, J., Park, K., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (1996). Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J.Physiol* 490, 351-362.

Blaisdell, C. J., Pellettieri, J. P., Loughlin, C. E., Chu, S., & Zeitlin, P. L. (1999). Keratinocyte growth factor stimulates CLC-2 expression in primary fetal rat distal lung epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20, 842-847.

Bosl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., & Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289-1299.

Catalan, M., Cornejo, I., Figueroa, C. D., Niemeyer, M. I., Sepulveda, F. V., & Cid, L. P. (2002). ClC-2 in guinea pig colon: mRNA, immunolabeling, and functional evidence for surface epithelium localization. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 283, G1004-G1013.

Chen, T. Y. (1998). Extracellular zinc ion inhibits ClC-0 chloride channels by facilitating slow gating. *J.Gen.Physiol* 112, 715-726.

- Clark, S., Jordt, S. E., Jentsch, T. J., & Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J.Physiol* 506, 665-678.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.
- Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M., & Rapisarda, C. (1997). Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia* 21, 217-227.
- Fritsch, J. & Edelman, A. (1997). Osmosensitivity of the hyperpolarization-activated chloride current in human intestinal T84 cells. *Am.J.Physiol* 272, C778-C786.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., & Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am.J.Physiol* 274, C500-C512.
- Furukawa, T., Ogura, T., Zheng, Y. J., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y., & Inagaki, N. (2002). Phosphorylation and functional regulation of CIC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *J.Physiol* 540, 883-893.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., & Fink, G. R. (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 4046-4050.
- Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759-762.

- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 114, 193-197.
- Huber, S., Schroppel, B., Kretzler, M., Schlondorff, D., & Horster, M. (1998). Single cell RT-PCR analysis of CIC-2 mRNA expression in ureteric bud tip. *Am.J.Physiol* 274, F951-F957.
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., & Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348, 510-514.
- Jordt, S. E. & Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the CIC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582-1592.
- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., & Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797-800.
- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., & Jentsch, T. J. (2001). Loss of the CIC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell* 104, 205-215.
- Kuchenbecker, M., Schu, B., Kurz, L., & Rudel, R. (2001). Topology of the human skeletal muscle chloride channel hCIC-1 probed with hydrophilic epitope insertion. *Pflugers Arch.* 443, 280-288.

- Lin, C. W. & Chen, T. Y. (2000). Cysteine modification of a putative pore residue in ClC-0: implication for the pore stoichiometry of ClC chloride channels. *J.Gen.Physiol* 116, 535-546.
- Lin, Y. W., Lin, C. W., & Chen, T. Y. (1999). Elimination of the slow gating of ClC-0 chloride channel by a point mutation. *J.Gen.Physiol* 114, 1-12.
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S. P., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig, I. W., & Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445-449.
- Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., & Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl-channel. *Am.J.Physiol* 268, C191-C200.
- Miller, C. (1982). Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroporax. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 299, 401-411.
- Mindell, J. A. & Maduke, M. (2001). ClC chloride channels. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3003.
- Miyazaki, H., Uchida, S., Takei, Y., Hirano, T., Marumo, F., & Sasaki, S. (1999). Molecular cloning of CLC chloride channels in *Oreochromis mossambicus* and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 255, 175-181.

- Mohammad-Panah, R., Gyomorey, K., Rommens, J., Choudhury, M., Li, C., Wang, Y., & Bear, C. E. (2000). ClC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *J.Biol.Chem.* 275 Pt 3, -2.
- Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath-Morrow, S. A., Guggino, W. B., & Zeitlin, P. L. (1995). ClC -2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12, 597-604.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci.Am.* 266, 44-51.
- Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H. V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2002). Loss of hyperpolarization-activated Cl(-) current in salivary acinar cells from Clcn2 knockout mice. *J.Biol.Chem.* 277, 23604-23611.
- Nobile, M., Pusch, M., Rapisarda, C., & Ferroni, S. (2000). Single-channel analysis of a ClC-2-like chloride conductance in cultured rat cortical astrocytes. *FEBS Lett.* 479, 10-14.
- Saviane, C., Conti, F., & Pusch, M. (1999). The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J.Gen.Physiol* 113, 457-468.
- Schmidt-Rose, T. & Jentsch, T. J. (1997). Transmembrane topology of a ClC chloride channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 7633-7638.
- Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B., & Cutting, G. R. (1998). Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3879-3884.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E., & Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat.Genet.* 17, 171-178.

Smith, R. L., Clayton, G. H., Wilcox, C. L., Escudero, K. W., & Staley, K. J. (1995). Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J.Neurosci.* 15, 4057-4067.

Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., & Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17, 543-551.

Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60.

Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., & Bear, C. E. (1999). CIC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J.Membr.Biol.* 167, 215-221.