



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina**

**PROFESOR PATROCINANTE:
DR. PABLO CID S.
CENTRO DE ESTUDIOS CIENTIFICOS**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:
DR. JAIME FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de una mutación intrónica en la función del canal de
cloruro CIC-2.**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al **Título de Biólogo Marino**

MANUEL YAMIL YUSEF ROBLES

VALDIVIA - CHILE

2004

A MI MADRE Y FAMILIA.

AGRADECIMIENTOS

Deseo comenzar agradeciendo a mi madre y familia por el apoyo, amor incondicional y paciencia que me han prodigado durante todos estos años.

Andrea en este último tiempo mi vida ha sido iluminada por ti. Tu también estas aquí, gracias por tu infinito amor.

El buen término de una tesis, según mi punto de vista, depende de variados factores. Uno de los fundamentales es la calidad humana y profesional del profesor patrocinante. En Pablo Cid, encontré a un amigo lleno de sabiduría y un profesor paciente, el que me enseñó con cariño lo necesario para lograr el objetivo.

No necesariamente solo existe un profesor que te guía por este escabroso camino. Es por esto, que debo agradecer de manera especial a María Isabel Niemeyer y Francisco Sepúlveda por el tiempo y las valiosas lecciones que he aprendido de ambos.

No puedo dejar de mencionar a los profesores miembros de mi comisión calificadora, Jaime Figueroa y Julio Lamilla, quienes con tan buena disposición revisaron este trabajo, realizando críticas que enriquecieron el contenido del mismo.

Quiero agradecer a mis amigos, Joel Castro y Luis Vargas pues esta tesis no hubiese sido posible sin ustedes y su apoyo.

También agradecer a mis compañeros de laboratorio Leandro Zúñiga, Marcelo Catalán, Ornar Porras y Carlos Flores Pínula, por sus consejos y amistad.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT N° 1020652 y Centro de Estudios Científicos (CECS).

ÍNDICE

	Páginas
1. Resumen	4
Summary	5
2. Introducción	6
2.1 Familia de canales de cloruro CIC	8
2.2 Canal de cloruro CIC - 2 y regulación de la excitabilidad neuronal	13
2.3 Epilepsia Idiopática Generalizada	15
2.4 Eventos de splicing alternativo como fuente de enfermedades	18
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	22
5. Objetivos específicos	22
6. Material y método	24
6.1 Cultivo celular	24
6.2 Transfección aguda	24
6.3 Extracción de RNA total	26
6.4 Transcripción reversa	27
6.5 Reacción en cadena de polimerasa	28
6.6 Subclonamiento del producto de amplificación	29
6.61 Transformación de células competentes	30
6.62 Digestión de DNA con enzima de restricción <i>Eco RI</i>	31
6.63 Purificación del DNA plasmidial	32
6.7 Construcción hCIC-2 Δ 74-117 acoplado a la proteína fluorescente verde	32

	Páginas
6.8 Electrofisiología	34
6.81 Teoría de la técnica del <i>patch clamp</i>	34
6.82 Obtención de corrientes microscópicas	36
6.83 Registros de <i>patch clamp</i> en su configuración de célula entera	37
6.84 Análisis de datos	38
6.9 Microscopía confocal	40
7. Resultados	42
7.1 Evaluación del procesamiento de MGWt y MG Δ	42
7.2 Función y expresión de hCIC-2 Δ 74-117	45
7.3 Localización de hCIC-2 Δ 74-117 GFP	48
8. Discusión	51
8.1 Procesamiento de MGWt y MG Δ	52
8.2 Evaluación funcional de hCIC-2 Δ 74-117	54
8.3 Localización subcelular de hCIC-2 Δ 74-117	55
9. Literatura citada	59

1. RESUMEN

CIC-2, miembro de la familia de canales de cloruro CIC, se expresa en neuronas y células gliales, donde participaría en la homeostasis del cloruro intracelular la cual es determinante en la regulación de la excitabilidad neuronal. La exacerbación patológica de esta última es la base de la epilepsia y la falta de función en un canal que participe en la inhibición neuronal podría dar cuenta de dicha alteración. Haug y colaboradores (2003) encontraron una delección de 11 pb en el intrón 2 del gen *CLCN2*, que co-segrega en pacientes con epilepsia idiopática generalizada de herencia autosómica dominante. Dicha delección, ubicada cercana a la región aceptora, podría afectar el **splicing** normal del mRNA y llevar a una pérdida de función de CIC-2. Para estudiar lo anterior se sintetizaron minigenes (con y sin la delección) y se transfectaron en 3 líneas celulares de origen diferente. La evaluación mediante RT-PCR demostró la existencia de 2 transcritos con y sin inclusión del exón 3 en una proporción similar e independiente del minigen transfectado. Luego, se realizó la delección del exón 3 en hCIC-2 (hCIC-2 Δ 74-117) y se analizó mediante expresión aguda en células HEK-293. Los estudios de **patch clamp** mostraron ausencia de corrientes y un nulo efecto del canal mutado sobre la función del silvestre cuando ambos fueron co-expresados, mientras que los estudios de microscopía confocal demostraron una ubicación preferentemente intracelular. En conclusión: a) la maquinaria de **splicing** pareciera no discriminar entre ambos minigenes en las tres líneas celulares usadas como modelo en nuestro estudio, b) la construcción hCIC-2 Δ 74-117 no produce corrientes debido a que esta no llega a la membrana plasmática y c) no existe efecto dominante negativo del canal mutado sobre la función y expresión del canal tipo silvestre.

SUMMARY

CIC-2 is a member of the CIC chloride channels family. It's expressed in neurons and glial cells, where it has been proposed participate in the intracellular chloride concentration homeostasis which affects neural excitability. The pathological increase of excitability is the base of epilepsy and the loss of function of a channel involved in neuronal inhibition could cause the disorder. A 11 base pair deletion in the *CLCN2* gene second intron co-segregating with idiopathic generalized epilepsy in a dominant way of inheritance manner was found by Haug and colleagues (2003). The deletion, located near to the splicing acceptor site, could affect the splicing of the normal mRNA, leading to CIC-2 channel loss of function. To study this minigenes (with and without the deletion) were transfected in 3 cellular lines of different origin. RT-PCR experiments demonstrated the presence of 2 transcripts corresponding to the inclusion or not of the exon 3 in a similar proportion and independently of the transfected minigene. The deletion of the exon 3 was made in hCIC-2 cDNA (hCIC-2 Δ 74-117) and was analyzed in acute expression en HEK-293 cells. The patch clamp studies established absence of chloride currents and no dominant negative effect when the wild type and mutant channels were co-expressed. Furthermore, confocal microscopy studies shown a prominent intracellular location of the mutant protein. In conclusion: a) the splicing machinery would not discriminate between both minigenes in the three cellular lines used as models in this study, b) the hCIC-2 Δ 74-117 construct does not reach the plasma membrane and nor generate sizable currents, c) there is not a dominant negative effect of the mutate channel upon the function and expression of the wild-type channel.

2. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos representan una clase heterogénea de proteínas encargadas de controlar el flujo de partículas cargadas eléctricamente (iones) hacia el interior o el exterior de las células. Estas proteínas tan especializadas conducen los iones de una manera predecible y extremadamente eficiente (hasta 10^9 iones por segundo). El flujo iónico que se genera por la actividad de los canales crea corrientes eléctricas minúsculas (en el orden de 10^{-12} a 10^{-10} amperios por canal) suficientes como para producir cambios rápidos en el voltaje de la membrana plasmática, es decir el potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular.

Los canales iónicos transitan aleatoriamente entre distintos estados conformacionales que se pueden detectar electrofisiológicamente como estados conductivos de corriente (abierto) y no conductivos (cerrado). El proceso de transición entre estos estados se conoce como mecanismo de compuerta o ***gating***. Algunos canales pueden aumentar o disminuir su probabilidad de apertura sin importar el valor del potencial de membrana y se dice que su ***gating*** es independiente de potencial. Es así como encontramos canales que aumentan su probabilidad de pasar a un estado conductivo frente a interacciones específicas con ligandos extracelulares o intracelulares (canales activados por ligandos); o por estímulos físicos (mecanorreceptores y canales sensibles a temperatura). En contraste, otros canales están normalmente cerrados, pero su probabilidad de apertura puede incrementarse de manera sustancial por cambios en el potencial de membrana (canales iónicos sensibles a voltaje). Cuando un canal iónico se abre, los iones permeantes son capaces de

moverse a través de él y la dirección en que se mueven está determinada por el gradiente electroquímico que representa la suma del gradiente químico a través de la membrana plasmática y el campo eléctrico que experimenta el ion.

Los canales iónicos suelen denominarse en función de su permeabilidad y selectividad para ciertos iones en condiciones fisiológicas, es así como encontramos canales de sodio, potasio, calcio y cloruro.

Los canales de cloruro (Cl^-) forman poros tanto en la membrana plasmática como en membranas intracelulares. En condiciones fisiológicas son permeables fundamentalmente al Cl^- , pero también a otros aniones monovalentes tales como yoduro, bromuro, nitratos y fosfatos. Desde un punto de vista funcional los canales de Cl^- han sido clasificados de acuerdo a su mecanismo de apertura, el cual puede depender de cambios en el potencial de membrana (canales de Cl^- activados por voltaje, familia CIC), de la fosforilación de residuos intracelulares por proteínas kinasas o por la unión o hidrólisis de ATP (CFTR), de un incremento en el Ca^{2+} intracelular (canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , CaCC), hinchamiento celular (canales aniónicos regulados por volumen, VRAC) o unión de un ligando [canales activados por glicina o ácido γ - aminobutírico (GABA)].

Los canales de Cl^- tienen una expresión ubicua y se encuentran en todas las células eucarióticas, en células de origen vegetal, protozoos, bacterias y hongos. Estos desempeñan importantes funciones en diversos procesos tales como regulación del volumen celular, regulación del pH en organelos, transporte transepitelial y regulación de la excitabilidad en nervio y músculo.

Se han identificado una serie de mutaciones en genes que codifican para estos canales que han demostrado ser causa de patologías; por ejemplo una mutación en el gen que codifica para CFTR ($\Delta F508$) provoca una falla en la localización de dicho canal en la membrana apical de epitelios secretorios, resultando en una severa patología pancreática y pulmonar (Faustino & Cooper, 2003). Mutaciones en genes que codifican para canales pertenecientes a la familia CIC también son causa de enfermedades; es así como mutaciones en el gen *CLCN1*, que codifica para CIC-1 expresado predominantemente en células del músculo esquelético, causan miotonía congénita (Koch *et al.*, 1992), enfermedad que se caracteriza por una relajación retrasada de los músculos después de su contracción; mutaciones en el gen *CLCN5* que codifica para CIC-5 causa la enfermedad de Dent, caracterizada por nefrolitiasis y proteinuria (Lloyd *et al.*, 1996). Mutaciones en el gen *CICN-Kb* que codifica para el canal de cloruro CIC-Kb, ubicado en el riñón (membrana basolateral de las células de la rama ascendente gruesa del asa de Henle), han sido observadas en pacientes con síndrome de Bartter tipo III (Simon *et al.*, 1997), una tubulopatía que se caracteriza por un defecto en la capacidad del riñón para reabsorber cloruro y potasio.

2.1 Familia de canales de cloruro CIC

La familia de canales de cloruro tipo CIC fue inicialmente identificada por clonamiento y expresión del canal de Cl^- activado por voltaje CIC-0 desde el órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Jentsch *et al.*, 1990). En mamíferos, esta familia se encuentra conformada por 9 miembros (Figura 1). CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y CIC-Kb son

canales de cloruro que se encuentran en la membrana plasmática; CIC-3 es probablemente un canal ubicado en organelos intracelulares pero también puede estar ubicado en la membrana plasmática (CIC-3B); mientras que CIC-4, CIC-5, CIC-6 y CIC-7 se cree que residen predominantemente en membranas intracelulares.

La Familia CIC de canales de cloruro

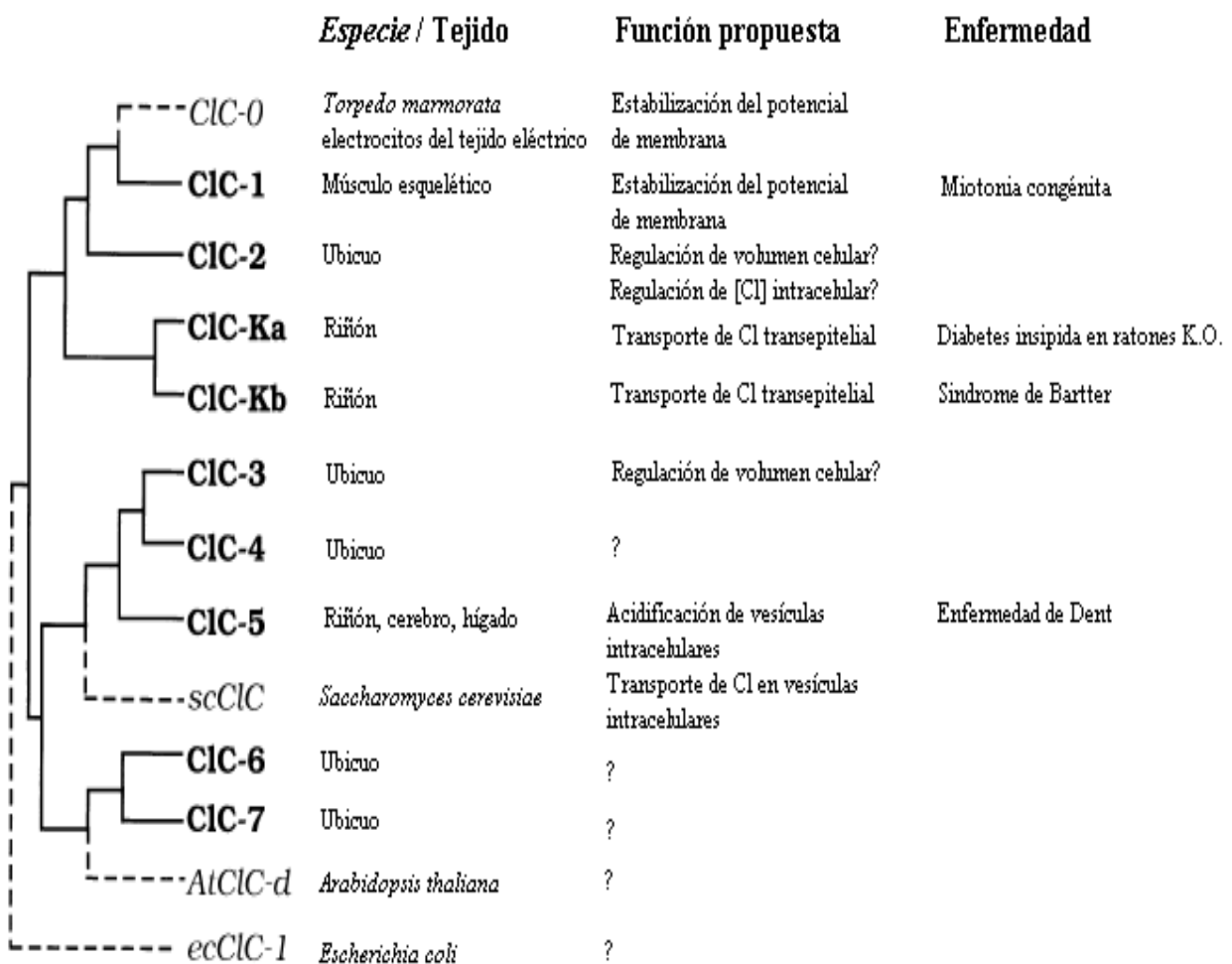


Figura 1: Familia de canales de cloruro CIC. Agrupados de acuerdo al grado de homología que presentan con respecto al primer canal clonado (CIC-0), se indica ubicación, función y enfermedades asociadas a ciertos miembros de esta familia (Jentsch *et al.*, 1996).

Una característica distintiva de los canales pertenecientes a la primera rama de esta familia (CIC-0, CIC-1 y CIC-2) es su apertura dependiente de potencial. El mecanismo de la dependencia de voltaje para la apertura de estos canales es complejo y ha sido descrito por un modelo de "doble cañón", asumiendo que el canal consiste de dos poros idénticos (Middleton *et al.*, 1996; Ludewig *et al.*, 1996, 1997; Fahlke *et al.*, 1998; Jentsch *et al.*, 1999, 2001; Weinreich & Jentsch, 2001). Cada poro tiene una "compuerta rápida" y "una compuerta lenta" que es común para ambos (Pusch *et al.*, 1995, 1997; Chen, 1998; Lin *et al.*, 1999).

La secuencia de permeabilidad para aniones monovalentes de los miembros de la familia CIC es $P_{Cl^-} > P_{Br^-} > P_{I^-}$ y es diferente de otros tales como canales activados por ligando y CaCC.

El primer modelo topológico propuesto para los miembros de esta familia se basa en el análisis hidropático de la secuencia aminoacídica de CIC-0 (Jentsch *et al.*, 1990). De acuerdo a este último se propuso la existencia de 13 dominios de transmembrana, D1 - D13, con los extremos carboxilo y amino terminal citosólicos. Sin embargo, un importante avance en el entendimiento de la estructura y función de estos canales vino de estudios recientes mediante cristalografía de rayos X de los canales de origen bacteriano StCIC (*Salmonella typhimurium*) y EcCIC (*Escherichia coli*) (Dutzler *et al.*, 2002). De acuerdo a este, dichos canales presentarían 18 α hélices denominadas A – R (Figura 2a), las que en su mayoría no atravesarían por completo la membrana y estarían dispuestas en forma antiparalela, lo que permite la presencia del Cl^- en el centro de la membrana de manera energéticamente favorable debido a su interacción con la parte positivamente cargada del amino terminal de la hélice D, el lazo entre las

hélices E/ F y M/ N y el amino terminal de la hélice R (Figura 2b). Además, este demostró que los canales CIC presentan una estructura cuaternaria homodimérica.

Los canales cristalizados presentan un 11 % de identidad con respecto a 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.

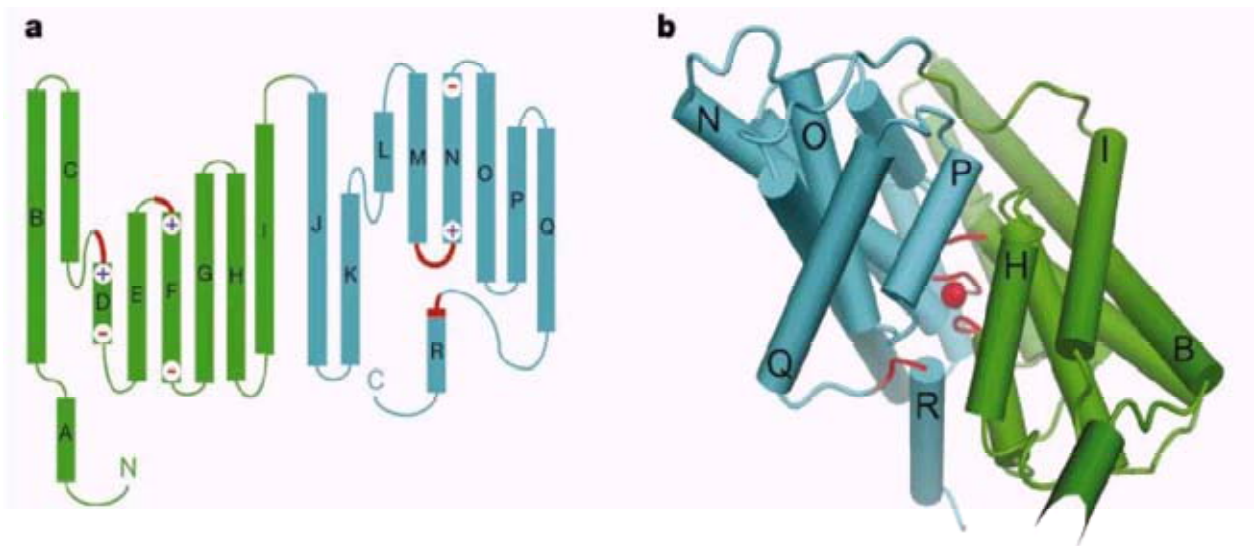


Figura 2: Estructura de una subunidad de StCIC. Representación en forma de cilindros de las regiones α -hélice denotadas (A-R), se indica las regiones formadoras del filtro de selectividad mediante color rojo (a) y representación espacial de las regiones α -hélice, indicándose además la presencia de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

Estudios precedentes habían demostrado que el mecanismo de **gating** de estos canales depende del anión permeante (Pusch *et al.*, 1995; Chen & Miller, 1996). Recientemente, se ha comenzado a entender el mecanismo del **gating** rápido basado en análisis cristalográficos y de mutagénesis sitio dirigidas de EcCIC y CIC-0 (Dutzler *et al.*, 2003). De acuerdo a este estudio existen dos sitios para la coordinación del Cl⁻ dentro del filtro de selectividad (interno y central). La cadena lateral de un residuo de glutamato (E148), altamente conservado entre los miembros de la familia CIC, se une a un tercer sitio (externo) obstruyendo cada uno de los protoporos, constituyendo el estado cerrado del canal. Cuando E148 es mutado a un aminoácido neutro, un ion Cl⁻ toma el lugar de la cadena lateral de E148. (estado abierto) (Dutzler *et al.*, 2003). En condiciones normales el mecanismo de **gating** se explicaría por la competencia del ion permeante con la cadena lateral del glutamato por el tercer sitio. Actualmente se están realizando diversos estudios para verificar si el modelo derivado de los CIC bacterianos es extrapolable a los canales CIC de mamíferos. Ejemplo de lo anterior son los estudios realizados en CIC-2 de cobayo (Niemeyer *et al.*, 2003), donde la neutralización del residuo E217 (homólogo al E148 de EcCIC) provocó una pérdida del **gating** rápido evidenciado por cambios en la dependencia del Cl⁻ intracelular y sensibilidad al voltaje de la activación del canal.

2.2 Canal de cloruro CIC - 2 y regulación de la excitabilidad neuronal

CIC-2, uno de los nueve miembros de la familia CIC, se expresa en forma ubicua, mostrando niveles relativamente altos en cerebro y epitelios (Thiemann *et al.*, 1992). Es así como el transcrito correspondiente a CIC-2 y la proteína propiamente tal han sido identificados en neuronas hipocampales, de la corteza y células mitrales del bulbo olfatorio entre otras (Smith *et al.*, 1995; Clayton *et al.*, 1998; Sik *et al.*, 2000).

Corrientes de Cl^- tipo CIC-2, caracterizadas por una lenta activación por hiperpolarización (Gründer *et al.*, 1992; Jordt & Jentsch, 1997) y una probabilidad de apertura dependiente tanto del potencial de membrana como de la concentración de Cl^- intracelular ($[\text{Cl}^-]_i$), han sido reportadas en células gliales (Nobile *et al.*, 2000) y neuronas hipocampales (Staley, 1994; Smith *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1998).

Se ha sugerido entonces, que CIC-2 jugaría un importante rol en la homeostasis del Cl^- intracelular en neuronas y en consecuencia en la respuesta a la activación de los receptores de glicina y GABA (Staley, 1994; Smith *et al.*, 1995), principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso.

En células piramidales de la corteza de mamíferos post-natales, el gradiente de concentración de reposo favorece el influjo aniónico neto, por lo que la apertura de los receptores GABA_A , resulta en la hiperpolarización de la membrana neuronal, mecanismo principal de inhibición sináptica (Thompson, 1994; Olsen & MacDonald, 1994). Sin embargo, existen neuronas que son depolarizadas por la activación de los receptores GABA_A y glicina, incluyendo neuronas inmaduras (Cherubini *et al.*, 1991; LoTuco *et al.*, 1995), algunos tipos de neuronas principales (Staley & Mody, 1992; Golding & Oertel,

1996) y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Ault & Hildebrandt, 1994; Rohrbough & Spitzer, 1996). Esta respuesta diferencial a los neurotransmisores se debe a un gradiente de Cl^- determinado fundamentalmente por la expresión de co-transportadores de K^+-Cl^- (KCC2) y $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC1) los que transportan al Cl^- en forma secundariamente activa. El primero, secundario al gradiente de potasio, permite la salida del cloruro desde la célula, el segundo acoplado al gradiente del sodio provoca la entrada del anión al intracelular. De esta manera, cuando el potencial de equilibrio del cloruro (E_{Cl}) es más negativo que el potencial de membrana de reposo (V_m), la apertura de canales de Cl^- , hiperpolariza la membrana disminuyendo la excitabilidad de dicha neurona. Al contrario, cuando E_{Cl} es más positivo que el V_m , la apertura de canales de Cl^- provocará depolarización de la membrana plasmática pudiendo alcanzar el potencial umbral para la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje, desencadenando de esta forma potenciales de acción.

Sin embargo, un mecanismo de transporte pasivo de Cl^- a través de un canal, por si mismo, no puede generar un E_{Cl} más negativo que el potencial de membrana de reposo como se observa en la mayoría de las neuronas. Está bien establecido que un transporte acoplado de K^+ y Cl^- hacia fuera, por el transportador KCC2, es necesario para generar la baja $[\text{Cl}^-]_i$ esencial para la inhibición GABAérgica. Un incremento en la $[\text{K}^+]_o$, tal como el inducido por la actividad de alta frecuencia en interneuronas GABAérgicas, afecta la tasa y dirección de este transporte. Esto puede causar un desacoplamiento de la extrusión de Cl^- o incluso un co-transporte hacia dentro de K-Cl por KCC2 (Haug *et al.*, 2003). Bajo estas condiciones KCC-2 parece ser la vía primaria de extrusión de Cl^- para reestablecer E_{Cl} y preservar la respuesta inhibitoria de GABA.

2.3 Epilepsia idiopática generalizada

La epilepsia es un síndrome neurológico muy heterogéneo que afecta aproximadamente entre el 1-3 % de la población mundial. Se denomina epilepsia idiopática generalizada (EIG) a casos en los cuales no se puede detectar lesiones cerebrales ni anomalías neurológicas y que además son generalmente de carácter hereditario. Esta patología tiene como característica principal un aumento anormal de la excitabilidad neuronal que induce convulsiones en forma recurrente, lo cual se debe a un desbalance entre las influencias excitatorias e inhibitorias en neuronas. Es válido hipotetizar entonces que mutaciones en proteínas involucradas en la generación y propagación del potencial de acción, como así también en aquellas involucradas en la regulación de la excitabilidad neuronal sean potenciales causas de epilepsia.

Es así como en los últimos años se han identificado un gran número de mutaciones en canales iónicos asociadas a variados fenotipos epilépticos (Tabla 1). Por ejemplo, una mutación en el gen que codifican para la subunidad $\beta 1$ (*SCN1B*) del canal de Na^+ dependiente de potencial, ha sido identificada en dos familias no relacionadas con epilepsia generalizada con convulsiones febriles (GEFS⁺). La mutación puntual que cambia un aminoácido, cisteína por triptofano (C121W), involucra un posible puente disulfuro en el dominio extracelular de la subunidad $\beta 1$ y afecta la cinética de apertura del canal. Estudios *in vitro* de la mutante C121W expresada en oocitos de *Xenopus levis* demostraron una falla en la inactivación del canal, lo cual resulta en una corriente de Na^+ aumentada e hiperexcitabilidad (Wallace *et al.*, 1998). Una mutación en el gen que codifica para el canal de K^+ dependiente de potencial, *KCNQ2*, fue identificada en

una familia con convulsiones neonatales familiares benignas (BFNS). Dicha mutación, una inserción de 5 pb cercana al extremo carboxilo terminal, provoca la delección de aproximadamente 300 aminoácidos. La expresión de la proteína truncada en oocitos de *X. levis* demostró que la mutación provoca la pérdida de la función normal del canal en homocigosis. Ya que los pacientes eran heterocigotos para dicha mutación, se co-expresó la proteína truncada junto con la tipo silvestre en oocitos de *X. levis*, estos experimentos demostraron una reducción significativa de estas corrientes, lo cual sugeriría que el aumento de la excitabilidad en estos casos sería secundario a una repolarización deficitaria de la membrana plasmática neuronal (Biervert *et al.*, 1998). Una mutación en el gen que codifica para la subunidad $\gamma 2$, *GABRG2*, del receptor de GABA_A ha sido recientemente identificada en una familia con GEFS⁺. La mutación puntual cambia un aminoácido, lisina por metionina (K289M) en el lazo extracelular que une los segmentos de transmembrana M2 y M3 de la subunidad $\gamma 2$. Los autores que reproducen esta mutación *in vitro* y utilizando oocitos de *X. levis* como sistema de expresión, demuestran que la subunidad mutada genera, junto a las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$, corrientes de cloruro activadas por GABA de amplitud mucho menor con respecto a los controles, lo cual es consistente con el potencial aumento de excitabilidad neuronal que explica el fenotipo de estos pacientes (Baulac *et al.*, 2001).

Gen	Síndrome
Canales iónicos activados por voltaje	
Canales de Na ⁺ :	
<i>SCN1A</i>	GEFS ⁺ y SMEI
<i>SCN2A</i>	BFNIS y GEFS ⁺
<i>SCN1B</i>	GEFS ⁺
Canales de K ⁺ :	
<i>KCNA1</i>	Convulsiones parciales
<i>KCNQ2</i>	BFNS y mioquimia
<i>KCNQ3</i>	BFNS
Canales iónicos activados por ligando	
Receptores de GABA:	
<i>GABRA1</i>	ADJME
<i>GABRG2</i>	CAE, FS y GEFS ⁺
Receptores de Acetilcolina:	
<i>CHRNA4</i>	ADNFLE
<i>CHRN2</i>	ADNFLE

Tabla 1: Genes asociados a síndromes epilépticos. Abreviaciones: ADJME, epilepsia mioclonica juvenil autosomica dominante; ADNFLE, epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosomica dominante; BFNIS, convulsiones neonatales e infantiles familiares benignas; BFNS, convulsiones neonatales familiares benignas; CAE, epilepsia ausente en infantes; FS, convulsiones febriles; GEFS⁺, epilepsia generalizada con convulsiones febriles; SMEI, epilepsia mioclonica severa en la infancia (Scheffer & Berkovic, 2003).

Recientemente se han identificado 3 mutaciones en el gen *CLCN2*, que codifica para CIC-2, en pacientes con tipos heterogéneos de EIG de herencia autosomica dominante (Haug *et al.*, 2003). Dos de estas mutaciones predicen una proteína truncada (M200fsX231) y un salto del exón 3 (del 74-117) respectivamente. Los autores proponen que dichas proteínas ejercerían un efecto dominante negativo llevando a una pérdida completa de función para el canal. La tercera produce la sustitución de un

aminoácido (G715E) en el carboxilo terminal la cual es asociada con una ganancia de función permitiendo que el canal este activo a $[Cl^-]$ reducidas.

2.4 Eventos de *splicing* alternativo como fuente de enfermedades

Uno de los procesos fundamentales en la maduración del mRNA es el ***splicing***, un seccionamiento de segmentos del mRNA precursor no codificantes o intrones y un posterior empalme de los segmentos codificantes o exones en el orden correcto para formar la cadena de mRNA maduro, que servirá como molde en la síntesis de proteínas. En este proceso los intrones son removidos por una estructura ribonucleica compleja denominada ***spliceosoma***, la cual se encuentra formada por varias ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) que contienen distintos tipos de RNAUs (U1, U2, U4, U5 y U6). Estos factores reconocen secuencias consenso en el intrón. Una en el extremo 5' (GU), sitio dador, el que denota el inicio del intrón, una en el extremo 3' (AG), sitio aceptor que señala el fin del intrón y una de ramificación que se encuentra entre 18–40 nucleótidos río arriba del sitio de corte 3' y que permitiría el reconocimiento del sitio aceptor más cercano. La partícula snRNP U1 posee un trozo de RNA con secuencia complementaria a la existente en las proximidades del extremo 5' de los intrones. Esto le permite aparearse al RNA precursor en el sitio dador del intrón. Por un mecanismo similar, snRNP U2 se une a la secuencia de ramificación. Luego se agregan al complejo U4 y U6, que forman un solo bloque y U5. El RNA precursor es seccionado en el extremo 5' del intrón por una reacción de transesterificación, es decir, se establece una nueva unión fosfodiéster entre el extremo 5' del intrón y el OH del

carbono 2 de la ribosa de un nucleótido de adenina en el sitio de ramificación. Como resultado de esta reacción se forma un lazo. A continuación se escinde la unión del extremo 3' del intrón y este queda libre. Una nueva transesterificación forma un puente diéster 3'-5' entre el extremo 3' del exón situado a la izquierda con el 5' del ubicado a la derecha. Finalmente, el intrón en forma de lazo es liberado y degradado por hidrólisis en el núcleo (Figura 3).

Muchos genes naturalmente experimentan lo que se denomina **splicing** alternativo, proceso en el cual diferentes sitios 5' y 3' son unidos permitiendo que genes individuales expresen múltiples mRNAs los cuales codifican para diversas isoformas proteicas. Más del 59 % de los genes humanos generan múltiples mRNAs por **splicing** alternativo (Lander *et al.*, 2001) y aproximadamente un 80 % de estos procesos resultan en cambios en la proteína codificada (Modrek & Lee, 2002) revelando que este proceso es probablemente la fuente primaria de diversidad proteica en humanos. El **splicing** alternativo genera segmentos de mRNA variables que pueden insertar o remover aminoácidos, correr el marco de lectura, o introducir un codón de terminación. Además, este proceso puede afectar también la expresión de los genes por remoción o inserción de elementos regulatorios controlando traducción, estabilidad del mRNA, o localización.

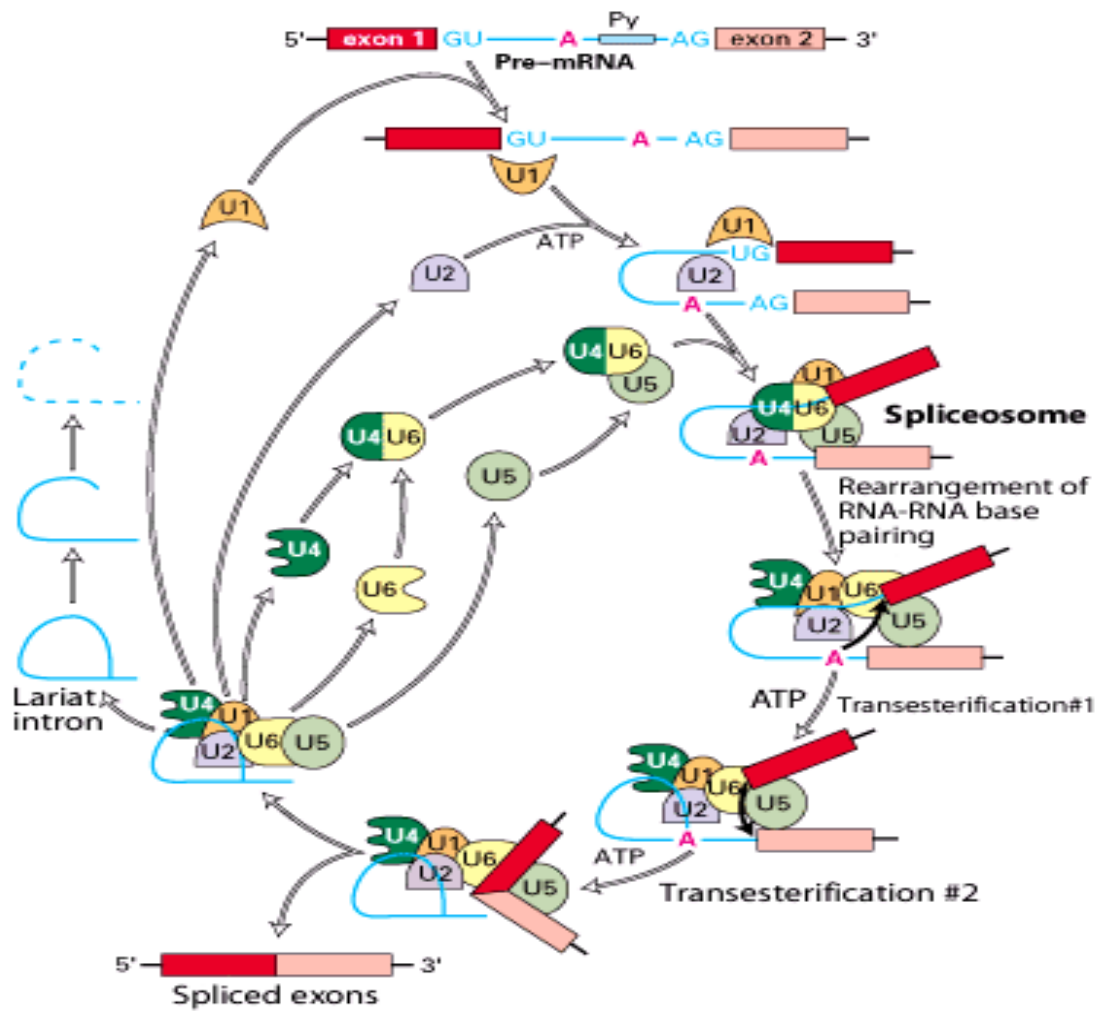


Figura 3: Representación esquemática del proceso de *splicing* del pre mRNA.

Una cantidad importante de enfermedades son causadas por mutaciones en genes humanos que afectan el *splicing* del RNA dando lugar de esta forma a eventos de *splicing* aberrante. Estas mutaciones pueden ser divididas en dos subclases, de acuerdo a su posición y efecto en el patrón de *splicing*. La subclase I (60 % de las mutaciones) incluye mutaciones en los sitios consenso, lo cual impide el reconocimiento del exón (salto del exón). La subclase II incluye mutaciones en motivos variables, lo

cual puede llevar al procesamiento correcto o aberrante de los transcritos ya sea por el debilitamiento o fortalecimiento en el reconocimiento del exón. En esta subclase se incluyen mutaciones intrónicas las cuales generan sitios dadores o aceptores crípticos lo que puede llevar a la inclusión parcial de alguna secuencia intrónica (Malka & Batsheva, 2002).

El **splicing** aberrante de mRNAs que codifican para proteínas críticas en la función adecuada de neuronas ha sido asociado a muchas enfermedades neurológicas. Por ejemplo la demencia frontotemporal hereditaria y parkinsonismo relacionado al cromosoma 17 (FTDP-17), es causada por mutaciones en el gen *tau* el que codifica para TAU (proteína neuronal que se une a los microtubulos promoviendo su ensamblaje y estabilidad). Al menos seis transcritos para esta proteína han sido identificados en el cerebro adulto en humanos, entre las cuales hay transcritos en que el exón 10 es alternativamente procesado. Muchas mutaciones afectando motivos importantes para el proceso, en o adyacentes al exón 10, han sido encontradas en pacientes con FDTP-17. Estas mutaciones llevan a un cambio en la proporción normal (1:1), entre los transcritos exón 10⁺ y exón 10⁻, conduciendo a la enfermedad (Spillantini *et al.*, 1998).

De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos una delección de 11 pares de bases cercana al extremo 3' en el intrón 2 de *CLCN2*, encontrada en pacientes con ciertos tipos de EIG con una herencia autosómica dominante (Haug *et al.*, 2003) podría provocar un trastorno en el **splicing** del pre mRNA y por lo tanto en la función de la proteína codificada a partir de este explicando así el fenotipo epiléptico. Dado lo anterior el objetivo de este trabajo es establecer la relación fisiopatológica entre la mutación antes mencionada y el fenotipo epiléptico.

3. HIPÓTESIS

La delección de 11 pb en el intrón 2 del gen *CLCN2*, produce una alteración patológica en el **splicing** del mRNA, generando así una proteína carente de función lo cual afectaría la excitabilidad neuronal dando cuenta del fenotipo epiléptico.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la delección de 11 pares de bases en el intrón 2 en el gen *CLCN2*, afecta el proceso de **splicing** del mRNA produciendo la exclusión del exón 3 y evaluar la expresión y función del hCIC-2 recombinante que carece de dicho exón.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Transfección aguda de minigenes recombinantes que incluyen los exones 2, 3 y 4 y los intrones 2 y 3 del gen *CLCN2* sin (MGWt) y con la delección de 11 pb en el intrón 2 (MG Δ) en tres líneas celulares de origen diferente.
2. Extracción del RNA total de las células transfectadas con los minigenes y evaluar el procesamiento de estos mediante transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa.
3. Construcción del cDNA codificante, en un vector de expresión en mamíferos, para un hCIC-2 carente de exón 3 (hCIC-2 Δ 74-117).

4. Evaluar las propiedades electrofisiológicas de hCIC-2 Δ 74-117 mediante la técnica de ***patch clamp*** en su configuración de célula entera.
5. Construcción del cDNA recombinante de una proteína de fusión hCIC-2 Δ 74-117 con la proteína fluorescente verde (GFP).
6. Evaluar la destinación subcelular de hCIC-2 Δ 74-117 GFP mediante microscopia confocal.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Cultivo celular

Para nuestro estudio se utilizaron tres líneas celulares N2a, HEK-293 y GT 1-7. El medio usado para su cultivo fue *Eagle`s modified Dulbecco`s medium* (DMEM) glucosa 25 mM, suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) 5-10%, aminoácidos no esenciales 1 %, glutamina 2-4 mM, F12 (células HEK-293) y Penicilina/ Estreptomicina 100 U y 100 µg/ ml. Estas células fueron incubadas en placas de poliestireno (Falcon) de 35 mm y mantenidas a 37 °C con CO₂ 5%.

6.2 Transfección aguda

La transfección de estas células tanto para la detección de los transcritos (RT-PCR) como para los estudios funcionales (*patch clamp*) y de localización (microscopía confocal) fue mediada por un lípido catiónico (Lipofectamina, INVITROGEN) que interactúa con el DNA para formar un complejo que es asimilado por la célula. El protocolo de transfección utilizado para los experimentos mencionados anteriormente es el que se describe a continuación:

RT-PCR, se preparó una mezcla de 1 µg del vector de expresión que contenía el cDNA codificante de interés (MGΔ o MGWt), 5 µl de Lipofectamina y 100 µl de DMEM sin suero. Esta fue incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, a

células N2a, GT 1-7 o HEK-293 (con un 60-80% de confluencia) se les reemplazó el medio utilizado comúnmente para su cultivo por DMEM libre de SBF (900 μ l). Luego, la mezcla fue adicionada a dichas células y estas fueron incubadas por 3 horas a 37 °C con CO₂ 5%. Por último, una vez transcurrido este tiempo el medio fue reemplazado y las células fueron incubadas por 48 horas para la posterior extracción del RNA.

Tanto para los experimentos de **patch clamp** como para los de microscopía confocal, el protocolo de transfección utilizado fue similar al descrito anteriormente pero con algunas modificaciones que se describen a continuación:

Patch clamp, células HEK-293 fueron transfectadas con una mezcla de 1 μ g del vector de expresión (pCR 3.1, INVITROGEN) que contenía el cDNA codificante para hCIC-2 o hCIC-2 Δ 74-117 y 0.3 μ g de π H3-CD-8 (este cDNA codifica para el antígeno de superficie CD-8). La expresión de este último se utilizó como medio de identificación de las células efectivamente transfectadas y esta se realizó mediante micro esferas (Dynabeads) cubiertas con el anticuerpo contra CD-8. Después de 18 horas de incubación las células transfectadas fueron puestas en contacto con las micro esferas (1 a 3 minutos) luego de lo cual se lavaron para eliminar el exceso y se montaron inmediatamente para los estudios funcionales.

Microscopía confocal, Células HEK-293 cultivadas sobre un portaobjeto de vidrio fueron transfectadas con 1 μ g del plasmidio (pEGFP-N1, CLONTECH) que contenía las construcciones GFP de hCIC-2 Wt o hCIC-2 Δ 74-117 e incubadas 24 horas luego de lo cual se montaron en una cámara de perfusión para su observación.

6.3 Extracción de RNA total

Para los experimentos de RT-PCR, el RNA total fue extraído 48 horas post-transfección utilizando el reactivo TRIzol (INVITROGEN), una solución monofásica de fenol y guanidina isotiocianato que produce lisis celular y una rápida inactivación de las desoxi-ribonucleasas manteniendo así la integridad del RNA (Chomczynski & Sacchi, 1987).

El protocolo utilizado para la extracción del RNA fue el siguiente:

1.- Homogenización, células transfectadas previamente con el MG Δ o MGWt fueron lisadas y homogenizadas directamente sobre la placa de cultivo (35 mm) con 1 mL de TRIzol.

2.- Separación de fases, luego fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación total de los complejos núcleoproteicos. Transcurrido este tiempo las muestras fueron transferidas a tubos de 1.5 mL y se agregaron 200 μ l de cloroformo, luego de lo cual los tubos fueron agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a no más de 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. Como resultado de la centrifugación la mezcla se separó en una fase fenol cloroformo de color rojo (en la parte inferior), una interfase y una fase acuosa (en la parte superior); esta última contenía el RNA.

3.- Precipitación del RNA, la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se mezcló con 500 μ l de isopropanol. Luego las muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a no más de 12000 x g por 10 minutos a 4 °C.

4.- Lavado del RNA, el RNA precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 75%, se mezcló por agitación y se centrifugó a no más de 7500 x g por 5 minutos a 4 °C.

5.- Resuspensión del RNA, luego de lo anterior se eliminó el sobrenadante y el RNA se secó por 5-10 minutos. Finalmente este fue disuelto en agua libre de RNAsas.

La cantidad de RNA obtenido fue determinada por espectrofotometría a 260 nm y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Desde el RNA total extraído se procedió a realizar una transcripción reversa.

6.4 Transcripción reversa

Esta reacción fue realizada usando el kit SuperScript II (INVITROGEN). 1-3 µg de templado (RNA total) fue transcrito con 50 unidades de transcriptasa reversa en una reacción de 20 µl conteniendo Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 0.5 µg/ µl, dNTPs 0.5 mM cada uno, MgCl₂ 2.5 mM, Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM y dithiothreitol (DTT) 10 mM. Las condiciones fueron las siguientes: una fase de denaturación a 65 °C por 5 minutos, seguida de una fase de síntesis a 42 °C por 50 minutos y una fase de terminación a 70 °C por 15 minutos. Posterior a esto y con el fin de remover el RNA remanente se utilizó *E. coli* RNAsa H en una reacción a 37 °C por 20 minutos, luego el cDNA sintetizado de esta forma fue guardado a -20 °C o bien fue usado inmediatamente en una reacción de PCR.

6.5 Reacción en cadena de polimerasa

Para los experimentos de PCR se utilizaron los siguientes partidores: uno en orientación sentido el cual denominamos E2S (5'- ATG TAT GGC CGG TAC ACT CAG G -3'), ubicado en el inicio del exón 2, y uno en orientación anti-sentido el que denominamos pCR 3.1 AS (5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG -3') ubicado río abajo del mini gen, en la zona de clonamiento múltiple del vector (Figura 4).

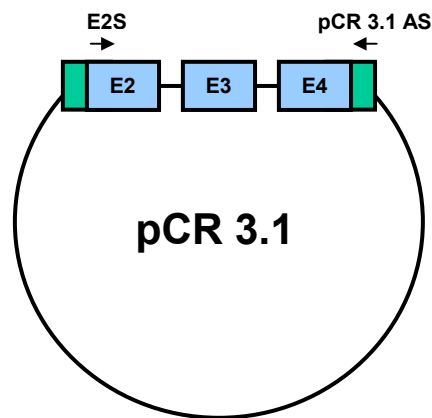


Figura 4: Representación esquemática para la ubicación de los partidores utilizados en los experimentos de PCR. El partidor en orientación sentido (E2S) se ubicó en el inicio del exón 2, mientras que el partidor antisentido (pCR 3.1 AS) se ubicó río abajo del minigen, en el sitio de clonamiento múltiple del vector pCR 3.1 (en verde).

Las mezclas de reacción contenían alícuotas de las siguientes soluciones estándar: templado (DNA), partidores 0.2 μ M, *Taq* DNA polimerasa (Fermentas) 2.5 u.e., dNTPs (INVITROGEN) 2 μ M, $MgCl_2$ 1 mM para un volumen final de reacción de 50 μ l.

Las condiciones usadas para estas reacciones fueron las siguientes: una fase inicial de denaturación a 94 °C por 2 minutos seguida de 30 ciclos con una temperatura de denaturación de 94 °C por 15 s, una fase de alineamiento a 58 °C por 30 s y una fase de elongación a 72 °C por 1 minutos, además de una fase final de elongación a 72 °C por 5 minutos. Estas condiciones fueron utilizadas en todas las reacciones de PCR realizadas.

Las reacciones de PCR, bajo estas condiciones, estuvieron en la fase de incremento lineal; esto fue verificado usando distinto número de ciclos para las PCRs (20 a 40 ciclos). Para su observación los productos de PCR fueron teñidos con bromuro de etidio en un gel de agarosa 1.5 % y la intensidad de los productos fue cuantificada usando el programa Scion Image.

6.6 Subclonamiento del producto de amplificación

Con el objetivo de secuenciar los productos derivados de RT-PCR, estos fueron subclonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). Este vector presenta una timidina extra en ambos extremos 3' terminal lo cual mejora la eficiencia de la reacción de ligación, además posee genes que confieren resistencia a antibióticos (ampicilina) y posee el gen de la β -galactosidasa. Este último permite la selección de las colonias que han sido transformadas con el vector religado (capaces de degradar la β -galactosa y presentan una coloración azul) de las colonias que poseen el vector ligado con el inserto deseado, el cual interrumpe la secuencia de este gen y por lo tanto incapaces de degradar β -galactosa presentando un color blanco. La reacción de ligación se

realizó usando la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) durante 16 h a 4 °C en un volumen final de 20 μ l. La relación molar entre inserto y vector fue de 5/ 1, siendo la concentración del vector de 50 ng/ μ l.

6.6.1 Transformación de células competentes

La reacción de ligación fue posteriormente usada para transformar células competentes DH5 α (INVITROGEN), las cuales se descongelaron a 4 °C. A 25 μ l de células competentes se les agregó 5 μ l de reacción de ligación y se incubaron en hielo por 30 minutos; luego de aplicar un golpe térmico por 1 minuto a 37 °C, se incubaron por 2 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 450 μ l de medio de cultivo LB líquido sin antibiótico y se mantuvo por 1 hora a 37 °C con agitación a 225 rpm, esto último para la expresión del gen de resistencia a ampicilina que proporciona el vector pGEM-T Easy en las células transformadas efectivamente.

Transcurrido este tiempo las células se cultivaron en placas con medio LB agar suplementadas con ampicilina 100 μ l/ ml, X-Gal 50 μ l/ ml e IPTG 20 μ l/ ml.

Las placas fueron incubadas a 37 °C toda la noche, luego de lo cual las colonias de color blanco fueron seleccionadas y crecidas en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina 100 μ l/ ml a 37 °C con agitación a 225 rpm.

Luego se realizó la extracción de DNA plasmidial por el método de hervido (Holmes & Quigley, 1981): bacterias efectivamente transformadas fueron transferidas a un tubo de 1.5 mL y precipitadas por centrifugación a 12000 rpm durante 3 minutos.

Posteriormente, las bacterias fueron lisadas y homogenizadas con 100 μ l de STET (una mezcla de Sacarosa 8%, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM y Triton X-100 5%), hervido por 1 minuto y centrifugado durante 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se le agregó 100 μ l de isopropanol y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm. El precipitado obtenido de esta forma (conteniendo el DNA y RNA bacteriano) se lavó con 500 μ l de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos. Por ultimo, este se secó durante 10 minutos y se resuspendió en agua estéril. Luego, se llevó a cabo un análisis de restricción para la confirmación de la presencia del inserto.

6.6.2 Digestión de DNA con enzima de restricción *Eco* RI

Para confirmar la existencia del producto de amplificación, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Eco* RI ya a que el vector pGEM-T Easy posee dos sitios de restricción *Eco* RI que flanquean el inserto. Para este procedimiento se tomaron 15 μ l de DNA purificado y se agregó 1 μ l de la enzima de restricción *Eco* RI, 2 μ l de buffer 10 X y 2 μ l de RNAsa, luego de lo cual la mezcla se incubó por una hora a 37 °C.

Finalmente, el resultado de la restricción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Las bandas de DNA fueron visualizadas por medio de tinción con bromuro de etidio en un transiluminador con una lámpara U.V. y fotografiadas para luego ser procesadas.

6.6.3 Purificación de DNA plasmidial

Una vez confirmada la existencia del producto de amplificación, se seleccionó una de las colonias con el patrón de bandeo positivo y fue crecida en medio de cultivo líquido LB (50 a 100 ml) con ampicilina 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ a 37 °C con agitación a 225 rpm toda la noche. Luego de lo cual el DNA plasmidial fue purificado utilizando el 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 determinada por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Finalmente se confirmó la secuencia del fragmento subclonado mediante secuenciación automática (Medigenomix, Alemania).

6.7 Construcción hCIC-2 $\Delta 74-117$ acoplado a proteína fluorescente verde

Con el propósito de establecer la localización subcelular de hCIC-2 $\Delta 74-117$, construcción realizada previamente para los estudios funcionales, este fue acoplado a la proteína fluorescente verde (GFP). Para esto se utilizó el vector de expresión en mamíferos pEGFP-N1 (CLONTECH), el que contiene el cDNA codificante para GFP.

La estrategia que se utilizó para generar esta construcción (Figura 5) es la que se describe a continuación: hCIC-2 Wt clonado en el vector pEGFP-N1 (hCIC-2 Wt GFP) y hCIC-2 $\Delta 74 - 117$ clonado en pCR 3.1 fueron digeridos con la enzima de restricción *Eco*

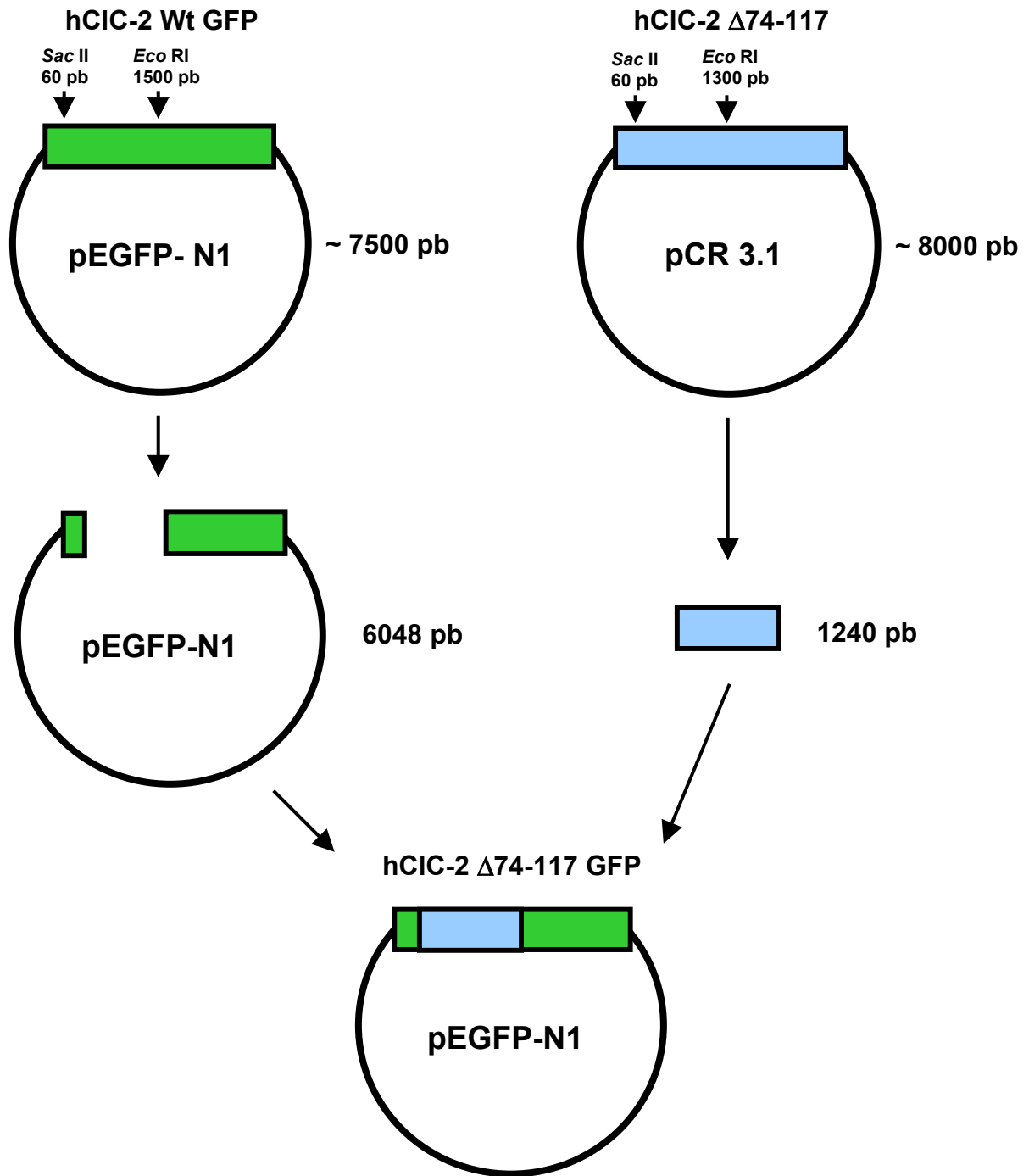


Figura 5: Representación esquemática de la estrategia utilizada para la construcción de hCIC-2 Δ 74-117 GFP. Tanto hCIC-2 Wt GFP como hCIC-2 Δ 74-117 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Sac* II, luego de lo cual los trozos obtenidos a partir de esta digestión (6048 pb y 1240 pb respectivamente) fueron ligados para transformar células DH5 α . El análisis de restricción realizado al DNA plasmidial de células DH5 α positivamente transformadas confirmó la presencia del inserto.

RI (sitio de restricción en 1500 pb) y *Sac* II (60 pb). Como resultado de esta digestión, para hCIC-2 Δ 74-117, se obtuvieron 2 bandas de las cuales se extrajo la de 1240 pb (hCIC-2 Δ 74-117 60–1300 pb), mientras que para hCIC-2 Wt GFP se obtuvieron 4 bandas de las cuales se extrajo la de 6048 pb (hCIC-2 Wt GFP 1500–3000 pb + pEGFP-N1). Posteriormente se ligaron ambos trozos, se transformaron células competentes DH5 α para luego crecerlas, purificar el DNA plasmidial y realizar un análisis de restricción con las enzimas *Eco* RI y *Sac* II. Una vez confirmada la presencia del inserto se creció la colonia con el patrón de bandeado positivo en medio LB líquido con kanamicina 100 μ l/ ml a 37 °C y con agitación a 225 rpm durante toda la noche. Luego de lo cual el DNA plasmidial fue purificado utilizando el sistema de purificación DNA Wizard plus midipreps (Promega). La cantidad de DNA extraído de esta forma fue determinada por espectrofotometría a 260 nm.

6.8 Electrofisiología

6.8.1 Teoría de la técnica de *patch clamp*

La técnica *patch clamp* es un método electrofisiológico desarrollado en 1979 por Neher y Sackmann, el cual permite el registro de corrientes a través de las membranas celulares 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 de

alta resistencia, el que debe ser del orden del giga ohm ($G\Omega$, $10^9\Omega$), que se establece entre la pipeta vidrio que contiene al micro electrodo inmerso en la solución de pipeta y la región de membrana circunscrita a esta.

La pipeta en contacto con la célula puede controlar el potencial de membrana debido a que está conectada a la entrada negativa de un amplificador operacional **A** (Figura 6) conectado a una alta resistencia de retroalimentación, cuya entrada positiva está 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** estará dado por la siguiente ecuación:

$$V_1 = -i_m R_f + V \quad (1)$$

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 potencial a la salida del segundo amplificador (**V₂**) es:

$$V_2 = -i_m R_f \quad (2)$$

Como el valor de la resistencia de retroalimentación se conoce, la magnitud generada por la actividad de canales iónicos se obtiene mediante la ecuación 2.

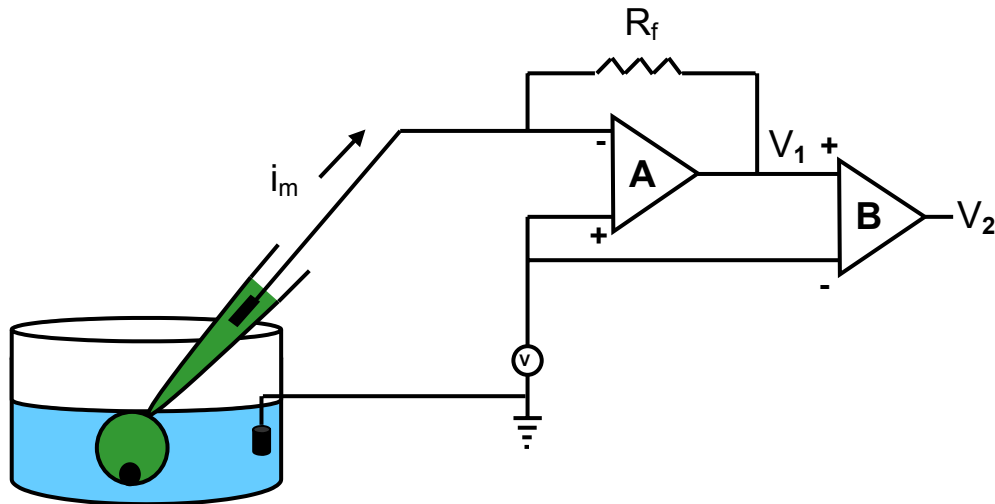


Figura 6: Circuito electrónico de la técnica de *patch clamp*. Básicamente este circuito actúa como un convertor corriente-potencial. Esto permite convertir pequeñas corrientes en cambios en el potencial monitoreables desde un osciloscopio o ser digitalizados para su almacenamiento y posterior análisis.

6.8.2 Obtención de corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas se obtienen 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***) (Figura 7). Esta configuración consiste en romper mediante una leve succión la superficie de la membrana que está circunscrita a 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.

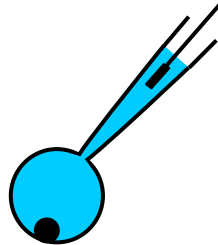


Figura 7: Variante célula entera de la técnica de *patch clamp*. Después de la formación del gigasello, se aplica una leve succión por la pipeta de registro. Como consecuencia de esto, el parche circunscrito a la pipeta se rompe, quedando la solución de pipeta en contacto con el contenido intracelular.

La técnica de *patch clamp*, además permite 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.

6.8.3 Registros de *patch-clamp* en su configuración de célula entera

Las placas de poliestireno que contenían las células marcadas con las micro esferas con el anticuerpo anti CD-8 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 fueron realizados 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 realizada por medio de una bomba peristáltica Pharmacia, las pipetas utilizadas para las mediciones se hicieron en un estirador (Sutter Instrument Co.) usando capilares de borosilicato (Harvard Apparatus), las resistencias de pipeta variaban entre 2-3 M Ω .

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 (en mM) Na gluconato 100, CsCl 33, MgCl₂ 1, EGTA 2, HEPES 10, pH 7.4 y la solución de baño NaCl 140, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, Sacarosa 20, HEPES 10, pH 7.4.

6.8.4 Análisis de datos

Este fue realizado por medio de los software Clampfit (Axon Instruments) y SigmaPlot. Las trazas de corriente de activación fueron ajustadas a una función exponencial doble del siguiente tipo:

$$I(t) = a_1 e^{(-t/\tau_1)} + a_2 e^{(-t/\tau_2)} + c \quad (3)$$

Donde $I(t)$ es la corriente en función del tiempo (t), τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo, a_1 y a_2 corresponden a las amplitudes de corrientes de los componentes

respectivos y c corresponde a la amplitud de la corriente de activación en el estado estacionario.

Para determinar la dependencia de potencial de la activación para el canal, las amplitudes de las corrientes de activación en el estado estacionario obtenidas a partir del ajuste a la ecuación 3 fueron transformadas a conductancia mediante la siguiente ecuación:

$$I = g \times (V_m - E_{Cl}) \quad (4)$$

Donde I es la amplitud de la corriente de activación en el estado estacionario, g es conductancia, V_m es el potencial de membrana, E_{Cl} el potencial de equilibrio para el cloruro.

Luego estos valores fueron normalizados a su máximo valor extrapolable y graficados en función del protocolo de pulsos utilizado (potenciales). La dependencia de voltaje, obtenida de esta forma, fue ajustada a la ecuación de Boltzmann (ecuación 5).

$$G = G_o + (G_{max} - G_o) / \{1 + \exp [(V - V_{0.5}) / k]\} \quad (5)$$

Donde G , G_o y G_{max} son la conductancia en función del voltaje, conductancia residual independiente de voltaje y la conductancia 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 k es la pendiente de dicha función.

Los potenciales de reversión obtenidos de los registros de corrientes fueron corregidos con respecto al potencial de unión líquida (-10.3 mV). Esta es la diferencia de potencial establecida entre los iones de la solución de baño y la de pipeta. Los experimentos electrofisiológicos fueron repetidos a lo menos cuatro veces y los datos son entregados como el promedio \pm error estándar de la media y las diferencias fueron evaluadas por medio del test de Student's considerando como diferencias significativas un valor $p < 0.05$.

6.9 Microscopía confocal

Para los estudios destinados a determinar la ubicación subcelular de las construcciones GFP de hCIC-2 Wt y hCIC-2 $\Delta 74-117$, se utilizó un microscopio confocal LSM 510 (Zeiss) equipado con un láser de Ar (488 nm) y otro de He-Ne (543 nm).

Células HEK-293 transfectadas con dichas construcciones fueron montadas en una cámara de perfusión y mantenidas en medio KRH que contenía (en mM) NaCl 136, KCl 4.7, CaCl_2 1.25, MgSO_4 1.24, HEPES 10, ajustado a pH 7.4 con Tris.

Con el objeto de marcar la membrana plasmática, estas células fueron tratadas con la sonda potenciométrica 1-(3-sulfonatopropil)-4-[[β [2-(di-*n*-octilamino)-6-naftil] vinil] piridino betaina (di-8-ANEPPS, Molecular Probes) 10 μM durante 2 minutos luego de lo cual fueron montadas para su observación.

Estos experimentos se realizaron usando un objetivo 63X / 1.2 W corr. La excitación tanto de GFP como de di-8-ANEPPS fue realizada simultáneamente con un láser de 488 nm por medio de una función de una vía (***single track***). La trayectoria del

haz de luz fue fijada usando un espejo dicróico primario de 488 nm y uno secundario de 545 nm. La luz emitida por GFP fue detectada en el canal 2 con un filtro de 505-530 nm y di-8-ANEPPS en el canal 1 con un filtro de 560-615 nm. El tamaño de las imágenes fue de 1024 X 1024 píxeles y el ***pinhole*** (diámetro de detección) fue de 110 μm .

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del procesamiento de MGWt y MG Δ

Con el objeto de establecer como la delección de 11 pb en el intrón 2, cercana al sitio aceptor, afecta el proceso de *splicing*, se construyeron 2 minigenes, uno conteniendo el intrón normal (MGWt) y otro llevando la delección (MG Δ) antes mencionada. Estos fueron transfectados, de manera independiente, en células N2a (derivadas de neuroblastoma de ratón), HEK-293 (derivadas de riñón de embrión humano) y GT 1-7 (neuronas hipotalámicas inmortalizadas de ratón) y su procesamiento fue evaluado por RT-PCR. Los resultados provenientes de esta aproximación demostraron que ambos minigenes generaron un mRNA del tamaño esperado para el procesamiento correcto de los exones 2/ 3/ 4 (495 pb) y otro de menor tamaño (365 pb) (Figura 8). Luego y con el objetivo de secuenciar ambos amplicones se procedió a subclonarlos en el vector pGEM-T Easy y para confirmar la existencia del producto de amplificación, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Eco RI* el cual confirmó la presencia de los insertos (Figura 9).

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los amplicones demostró que el producto de 465 pb efectivamente correspondía a los exones 2/ 3/ 4 mientras que el de 365 pb correspondía a los exones 2/ 4 del transcrito para hCIC-2, confirmando de esta forma el salto del exón 3 (Figura 10).

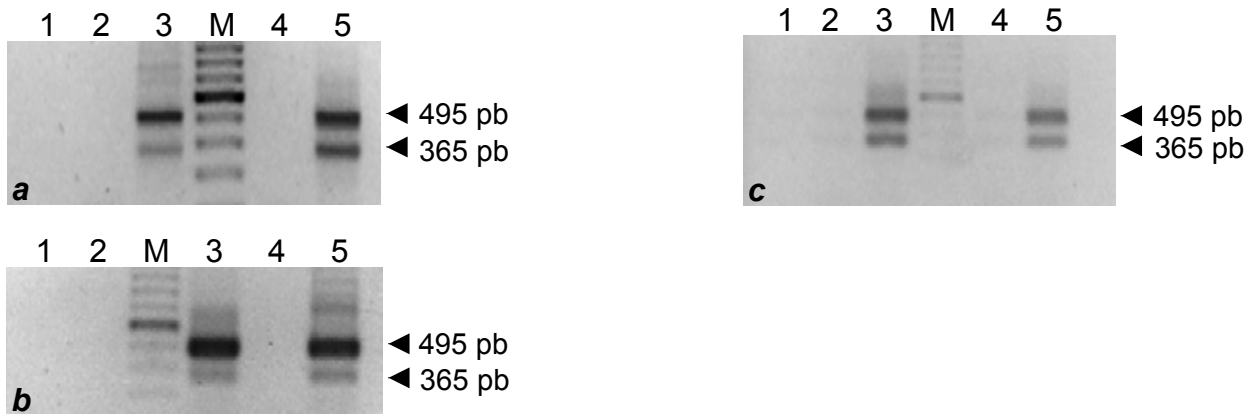


Figura 8: Efecto de la delección de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* sobre el procesamiento del mRNA. Resultados obtenidos a partir de la transfección aguda del MG Δ o MGWt en tres líneas celulares diferentes; N2a (a), GT 1-7 (b) y HEK-293 (c). Línea 1: control de agua. Líneas 2 y 4: controles sin transcriptasa para MGWt y MG Δ . Líneas 3 y 5: productos de RT-PCR para MGWt y MG Δ . El marcador de tamaños utilizado fue de 100 pb (M).

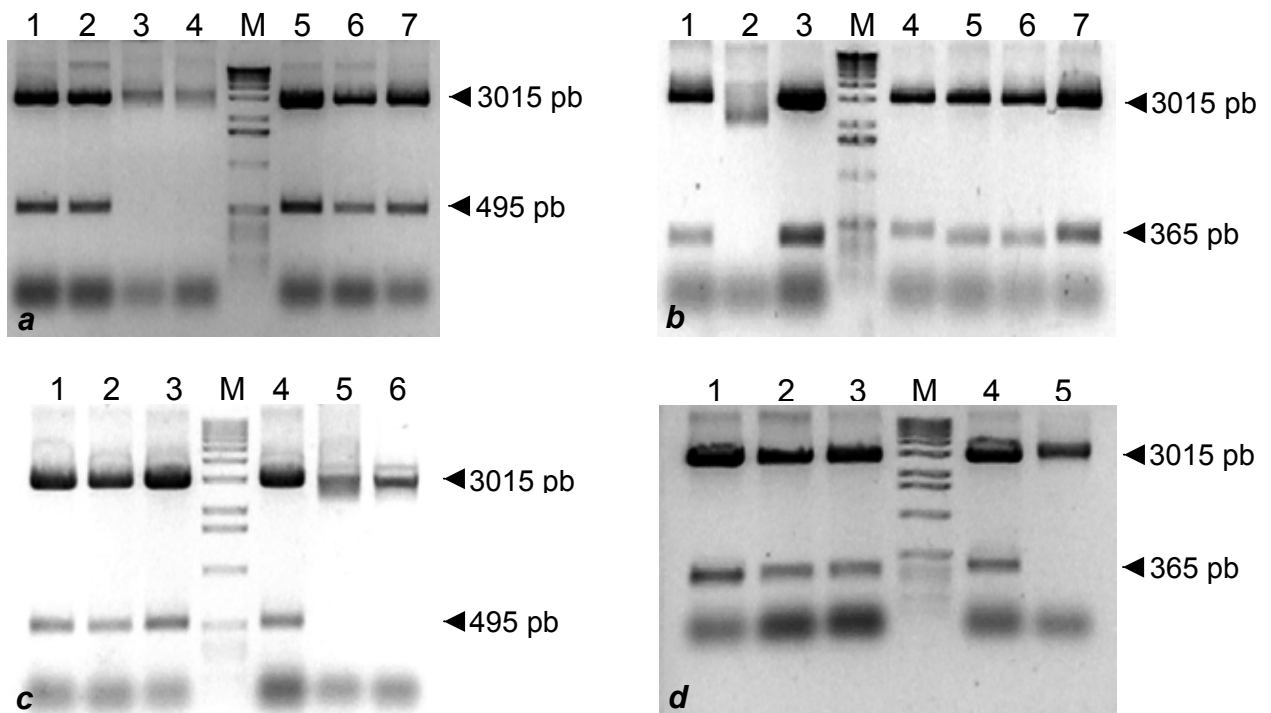


Figura 9: Digestión de DNA con enzima *Eco* RI. Realizado al DNA plasmidial extraído de células DH5 α positivamente transformadas con el vector pGEM-T Easy conteniendo los insertos correspondientes a los transcritos derivados del procesamiento del MGWt (a y b) y MG Δ (c y d). Cada línea representa una colonia positivamente transformada. El marcador de tamaños fue de 1000 pb (M).

495 pb

5'-ctctcccatatgggtcgacctgcaggcggccgcgaattcactagtgattatgtatggccgg
 L S H M V D L Q A A A N S L V I M Y G R
 tacactcaggaccttggggcctttgccaaagaggaagctgctcggattcgcctgggaggg
 Y T Q D L G A F A K E E A A R I R L G G
 cctgaaccctggaaagggtcccccttctctcgggctgccccagagctcttggaatatgga
 P E P W K G P P S S R A A P E L L E Y G
 cggagccggttgccgccgatgccgcgtctgttctgtcgcctgccacaagttcctagtatcc
 R S R C A R C R V C S V R C H K F L V S
 agggttgggtgaagattggatccttctcgggtcctgctggggcttctcatggcattggtcagc
 R V G E D W I F L V L L G L L M A L V S
 tgggtcatggactatgccattgctgcctgtctgcaagcccagcagtggtatgtcccggggc
 W V M D Y A I A A C L Q A Q Q W M S R G
 ttgaacaccagcatcttgctccagtacctggcctgggtcacctacctggtgtcctcatc
 L N T S I L L Q Y L A W V T Y P V V L I
 actttctcagccggattcacacagatcctggcccctcaggctgtcgggtatgtagaaaat-3'
 T F S A G F T Q I L A P Q A V G M L E N

365 pb

5'-ccaacgcggttgggagctctcccatatgggtcgacctgcaggcggccgcgaattcactagtg
 P T R W E L S H M V D L Q A A A N S L V
 attatgtatggccggtacactcaggaccttggggcctttgccaaagaggaagctgctcgg
 I M Y G R Y T Q D L G A F A K E E A A R
 attcgcttgggagggcctgaaccctggaaagggtcccccttctctcgggctgccccagag
 I R L G G P E P W K G P P S S R A A P E
 ctcttggaatatggacggagccggttgccgccgatgccgcgccagcagtggtatgtcccgg
 L L E Y G R S R C A R C R A Q Q W M S R
 ggcttgaacaccagcatcttgctccagtacctggcctgggtcacctacctggtgtcctc
 G L N T S I L L Q Y L A W V T Y P V V L
 atcactttctcagccggattcacacagatcctggcccctcaggctgtcgggtatgtagaaa-3'
 I T F S A G F T Q I L A P Q A V G M L E

Figura 10: Secuencia nucleotídica de los amplicones derivados del procesamiento de los minigenes. En ambos casos se confirmó que el producto de mayor tamaño (465 pb) correspondía a un transcrito que contenía los exones 2/ 3/ 4 del mRNA para hCIC-2 mientras que el de menor tamaño (365 pb) correspondía a uno que contenía los exones 2/ 4 del mismo. En rojo se destaca la secuencia aminoacídica para la cual codifica el exón 3.

Un aspecto interesante de los resultados anteriormente expuestos es el hecho de que ambos transcritos están presentes tanto en células transfectadas con el MG Δ como en aquellas transfectadas con el MGWt, debido a esto y con el objetivo de establecer si existe alguna diferencia en la proporción de ambos transcritos se realizaron

experimentos de RT-PCR semi-cuantitativa. Esta aproximación demostró que ambos transcritos fueron generados en una proporción similar e independiente del minigen transfectado. Es así como en células N2a la fracción que correspondía al transcrito carente de exón 3 fue 0.37 ± 0.04 y 0.32 ± 0.03 (promedio \pm S.E.M., $n = 6$) para el MGWt y MG Δ respectivamente. Estos resultados no revisten una diferencia significativa (t-test, $p = 0.1$). Experimentos realizados con células GT 1-7 y HEK-293 arrojaron resultados similares (Tabla 2).

	TIPO CELULAR		
	N2a	GT 1-7	HEK-293
MG Wt	0,37 \pm 0,04	0,37 \pm 0,04	0,43 \pm 0,02
MG Δ	0,32 \pm 0,03	0,35 \pm 0,04	0,42 \pm 0,02
<i>n</i>	6	3	3
<i>t</i> -test	0,11	0,32	0,30

Tabla 2: Fracción correspondiente al transcrito carente del exón 3. Esta demostró no presentar diferencias significativas tanto en células transfectadas con el MGWt como con el MG Δ . Los resultados son presentados como promedio \pm S.E.M.

7.2 Función y expresión de hCIC-2 Δ 74-117

El producto del procesamiento diferencial del mRNA de hCIC-2 daría lugar a una proteína con la delección casi total de la α -hélice B, que de acuerdo al modelo

cristalográfico propuesto por Dutzler y colaboradores (2002) sería la α -hélice más larga y se ubicaría en la interfase entre el canal y la membrana. Con el propósito de estudiar la función y expresión de dicha proteína se generó una construcción de esta a la que denominamos hCIC-2 Δ 74-117.

Los estudios funcionales para hCIC-2 Δ 74-117 demostraron la ausencia de corrientes atribuibles a su apertura ($n = 23$). Esto queda de manifiesto en la figura 11a donde se muestra un típico registro de corrientes totales en células HEK-293 positivamente transfectadas con la construcción. Estas fueron estimuladas con un protocolo de pulsos de +40 a -120 mV sin que algún tipo de corriente haya sido registrada. Esto contrasta con resultados obtenidos de experimentos similares realizados para hCIC-2 Wt (Figura 11b) donde se aprecia que a potenciales depolarizantes (potenciales positivos) no se observan corrientes atribuibles a la apertura del canal, mientras que a potenciales hiperpolarizantes (potenciales negativos) un aumento en el estímulo es concomitante con un incremento tanto en la amplitud de las corrientes como en la velocidad con que estas llegan a saturación.

Debido a que la delección de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* co-segrega en pacientes con ciertos tipos de EIG con una herencia autosómica dominante evaluamos el posible efecto dominante negativo de hCIC-2 Δ 74-117 sobre la función y expresión de hCIC-2 Wt. Para esto ambos fueron co-expresados en células HEK-293. Los resultados provenientes de estos experimentos demostraron que la función de hCIC-2 Wt no se vio afectada por su co-expresión con hCIC-2 Δ 74-117, ya que se observaron corrientes robustas y de una amplitud similar a las observadas para los estudios funcionales realizados sobre hCIC-2 Wt (Figura 12a). Además, no se apreciaron diferencias en la

dependencia de potencial (Figura 12b) pues al comparar los valores promedio obtenidos para el $V_{0.5}$ y el factor de pendiente no se observaron diferencias significativas (ambos en mV): -113 ± 3 y -27 ± 1 ($n=13$); -108 ± 4 y -23 ± 1 ($n=11$) respectivamente.

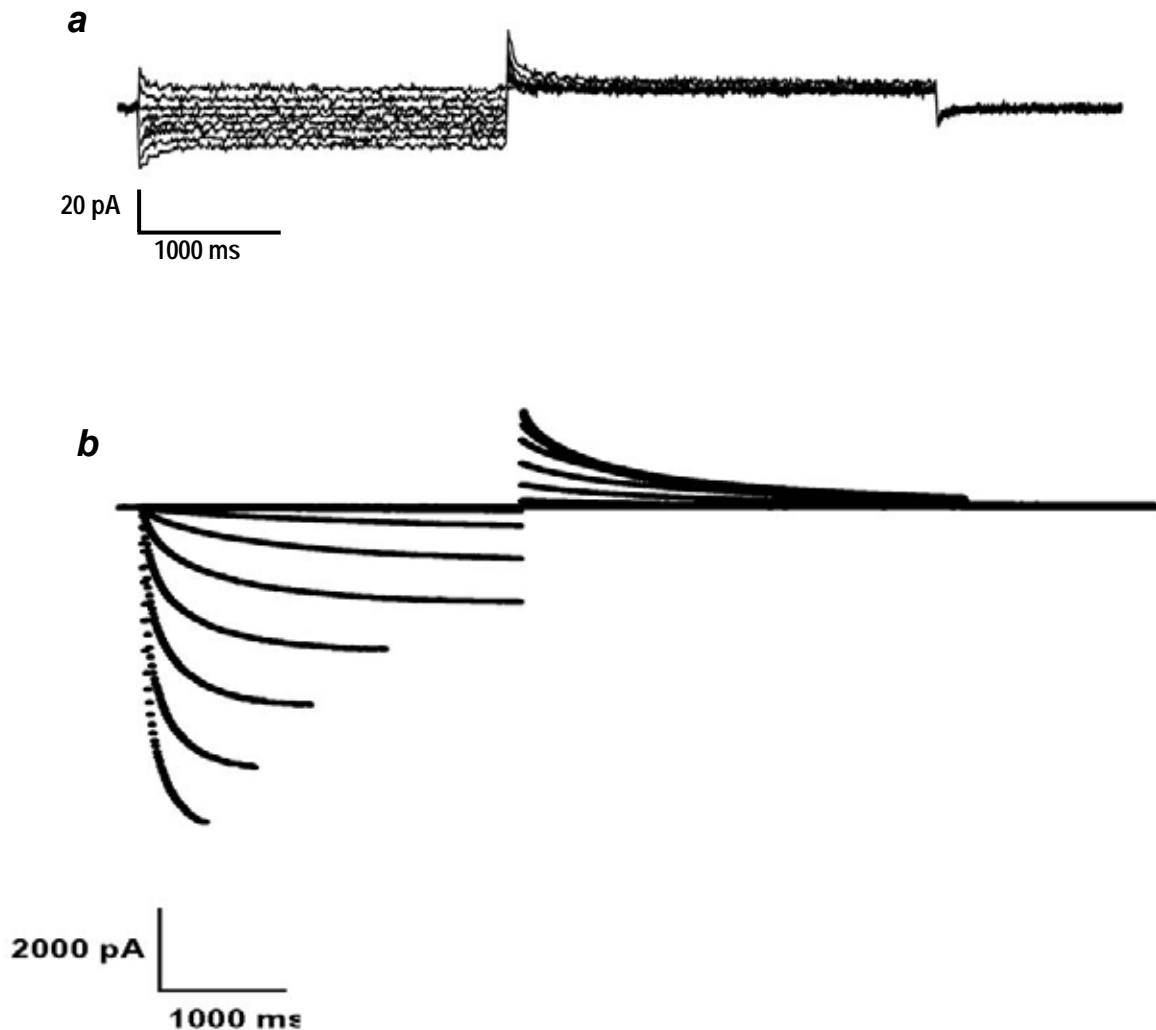


Figura 11: hCIC-2 Δ 74-117 no es funcional. Registros de corrientes totales para células HEK-293 agudamente transfectadas con hCIC-2 Δ 74-117 (a) y hCIC-2 Wt (b). El protocolo de pulsos fue el siguiente: para (a), pulsos cuadrados de 2,5 segundos cada 20 mV desde +40 a -120 mV, seguidos de un post-pulso de 3 segundos a +40 mV. En (b), los pulsos de activación fueron desde +40 a -180 mV, con una duración variable y el post-pulso fue igual que en (a).

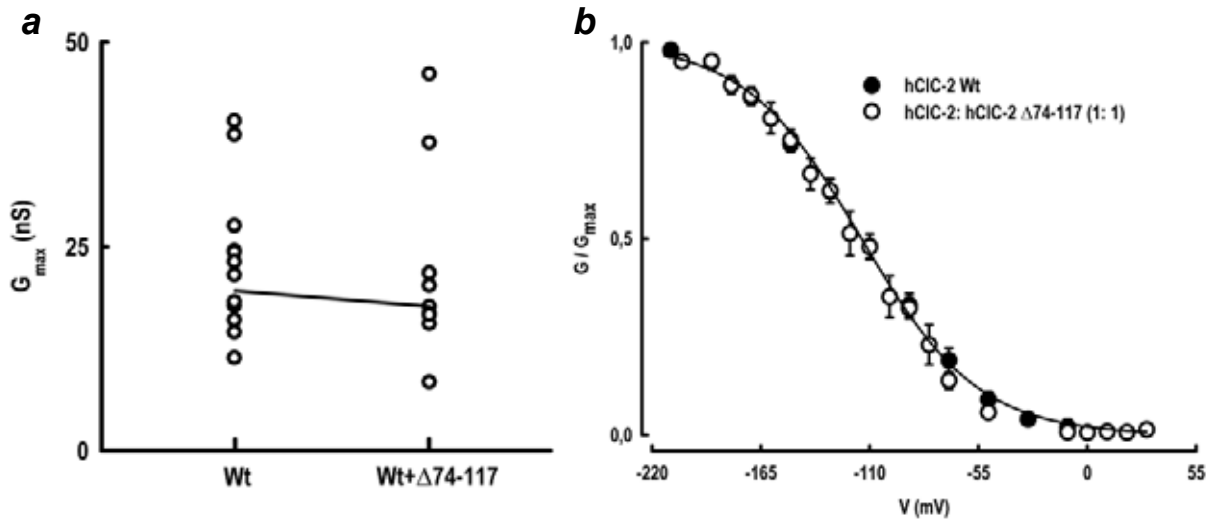


Figura 12: Análisis funcional de la co-expresión de hCIC-2 Wt y hCIC-2 Δ 74-117. (a) G_{max} para Wt y co-transfección de Wt+ Δ 74-117. G_{max} corresponde a la conductancia máxima a plena activación, extrapolada de la ecuación 5. Los puntos corresponden a los valores individuales y la línea conecta los valores promedio. (b) Activación en el estado estacionario como función del voltaje graficado para Wt y Δ 74-117. La línea es el resultado del ajuste a la ecuación 5 para los datos obtenidos de Wt. El ajuste para los datos obtenidos de la co-transfección del canal tipo silvestre y el mutado no difieren significativamente de los obtenidos para el tipo silvestre por si solo.

7.3 Localización de hCIC-2 Δ 74-117 GFP

Estudios anteriores han afirmado que hCIC-2 Δ 74-117 llega a la membrana plasmática ejerciendo un efecto dominante negativo que inhibe la actividad de hCIC-2 Wt (Haug *et al.*, 2003). En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, reexaminamos la localización de dicha mutante y la comparamos a la del canal tipo silvestre.

Para esto se generó una construcción GFP para hCIC-2 Δ 74-117 a la que denominamos hCIC-2 Δ 74-117 GFP. Los cDNAs recombinantes de hCIC-2 Wt GFP y hCIC-2 Δ 74-117 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Sac* II (Figura 13a) luego de lo cual se extrajo el DNA de 6048 pb y 1240 pb respectivamente. Posteriormente, estos fragmentos fueron ligados y luego usados para transformar células competentes DH5 α . Finalmente, el DNA plasmidial de las bacterias positivamente transformadas fue extraído y sometido a un análisis de restricción con las enzimas *Eco* RI y *Sac* II, lo que confirmó la presencia del inserto (1240 pb) ligado de esta forma al vector (Figura 13b).

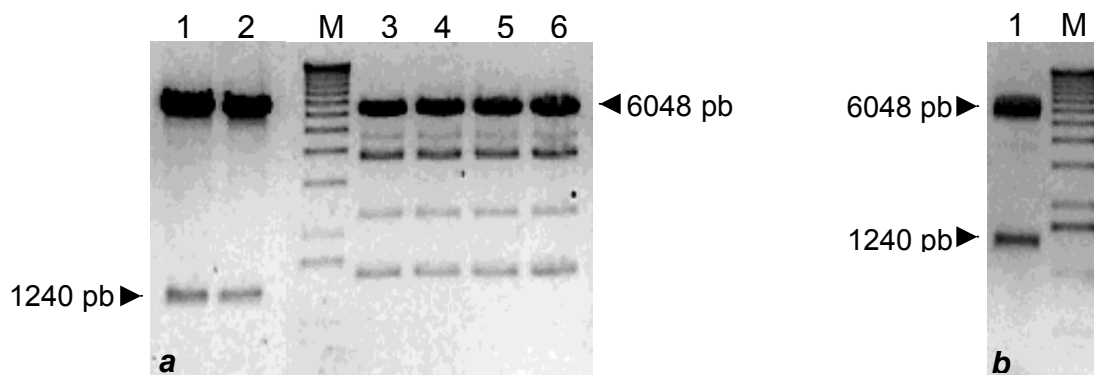


Figura 13: Construcción hCIC-2 Δ 74-117 GFP. (a) Digestión con enzimas de restricción *Eco* RI y *Sac* II de las construcciones hCIC-2 Δ 74-117 (líneas 1 y 2) y hCIC-2 Wt GFP (líneas 3 a 6). (b) Confirmación de la presencia del inserto (1240 pb), esto se realizó por análisis de restricción a hCIC-2 Δ 74-117 GFP con las enzimas *Eco* RI y *Sac* II (línea 1). Para ambos casos el marcador de tamaños fue de 1000 pb (M).

Una vez generada la construcción hCIC-2 Δ 74-117 GFP, tanto su distribución subcelular como la de hCIC-2 Wt GFP fue comparada con la de di-8-ANEPPS, un

marcador específico de la membrana plasmática. Los resultados provenientes de esta aproximación revelaron que hCIC-2 Wt GFP presenta un patrón de localización complejo (Figura 14a, en verde) con una importante marca en estructuras vesiculares. Además, se observó marca en la membrana plasmática, revelado por superposición con di-8-ANEPPS (Figura 14c, en amarillo), lo que sugiere que CIC-2 está localizado en áreas discretas de la membrana. En contraste, la ubicación subcelular de hCIC-2 Δ 74-117 GFP demostró ser intracelular (Figura 14d) sin que alguna superposición con di-8-ANEPPS haya sido observada (Figura 14f).

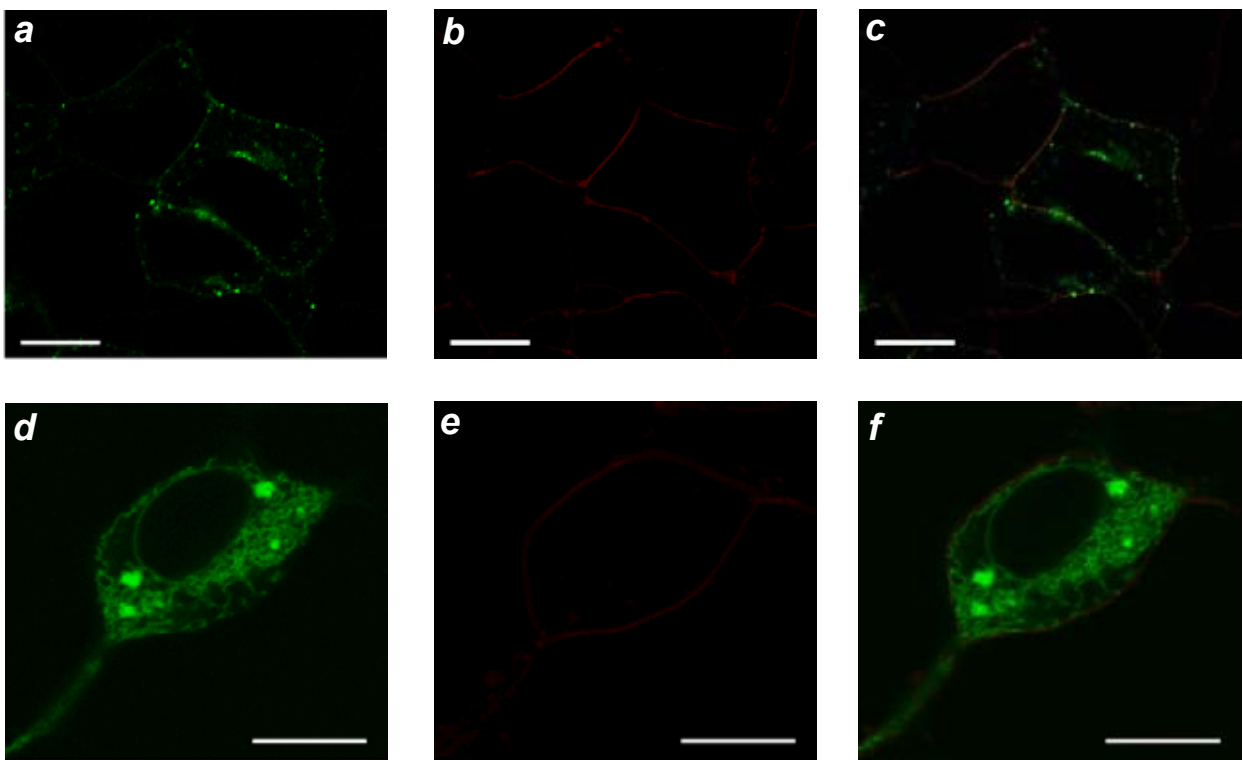


Figura 14: hCIC-2 Δ 74-117 no llega a la membrana plasmática. Células HEK-293 fueron transfectadas agudamente con las proteínas de fusión Wt GFP (a-c) o Δ 74-117 (d-f) y analizadas por microscopía confocal. La ubicación subcelular de las diferentes proteínas de fusión es mostrada en a y d. Para visualizar la membrana plasmática las células transfectadas fueron incubadas con di-8-ANEPPS mostrado en rojo en b y e. Una superposición de ambos fluoroforos es mostrada en c y f. Barra 10 μ m.

8. DISCUSIÓN

Los canales de cloruro pertenecientes a la familia CIC han demostrado su implicancia en diversas enfermedades. Esto como resultado del análisis de mutaciones en algunos de los miembros de esta familia asociadas a ciertas patologías o por modelos **knock-out** en ratones (Koch *et al.*, 1992; Lloyd *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1997; Bösl *et al.*, 2001). Se ha sugerido que CIC-2, uno de los nueve miembros de la familia CIC en mamíferos, tendría un rol importante en la mantención de la respuesta inhibitoria mediada por la apertura del receptor de GABA_A en neuronas (Staley, 1994; Smith *et al.*, 1995). Debido a lo anterior se ha especulado que la pérdida de función de CIC-2 podría resultar en hiperexcitabilidad neuronal (Staley *et al.*, 1996), siendo esta última el mecanismo patofisiológico fundamental de la epilepsia. Una serie de mutaciones asociadas a diversos fenotipos epilépticos han sido encontradas en genes que codifican para canales iónicos relacionados con la generación y propagación del potencial de acción como así también en aquellos involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal. Por ejemplo mutaciones en canales de Na⁺ (*SCN1A*, *SCN1B* y *SCN2A*), K⁺ (*KCNA1*, *KCNQ2* y *KCNQ3*) y en subunidades del receptor de GABA (*GABRA1* y *GABRG2*) han sido asociadas a síndromes de convulsiones infantiles y cierto tipos de epilepsias generalizadas (Scheffer & Berkovic, 2003). Es por todo lo anterior que ha sido interesante el hallazgo de un *locus* de susceptibilidad para epilepsia idiopática generalizada en el cromosoma 3q26 cercano al gen que codifica para CIC-2 en humanos (Sander *et al.*, 2000). Estudios recientes han encontrado tres mutaciones diferentes en este canal que co-segregan con tipos heterogéneos de EIG con una

herencia autosómica dominante (Haug *et al.*, 2003). Una de estas mutaciones es una deleción de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* que según los autores tendría un efecto dominante negativo llevando a una pérdida completa de función para el canal. En este trabajo se presenta un análisis del impacto de dicha mutación sobre el proceso de **splicing** y sus consecuencias sobre la función del canal de cloruro ClC-2. Nuestros resultados contrastan marcadamente con los previamente reportados por Haug y colaboradores (2003) y sugieren que el mecanismo patofisiológico propuesto por estos autores, y que da cuenta del fenotipo, necesita ser revisado.

8.1 Procesamiento de MGWt y MG Δ

Se ha descrito que mutaciones cercanas o en secuencias consenso del **splicing** pueden ser causantes de eventos de **splicing** aberrantes y debido a esto ser fuente de enfermedades en humanos (Malka & Batsheva, 2002; Faustino & Cooper, 2003). Es por esta razón que, por medio de una aproximación con minigenes, se probó el efecto de la deleción de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* sobre el proceso. Se construyeron 2 minigenes que incluían los exones 2, 3 y 4 y los intrones 2 y 3 del gen *CLCN2* sin (MGWt) y con la deleción de 11 pb en el intrón 2 (MG Δ). Estos fueron transfectados en tres líneas celulares de origen diferente para luego evaluar su procesamiento por RT-PCR. El principal hallazgo proveniente de estos experimentos fue que independiente de la presencia o ausencia de la deleción, se producen 2 transcritos. Uno del tamaño esperado para el procesamiento correcto de los exones 2/ 3/ 4 (495 pb) y otro de menor tamaño (365 pb) producido en adición al anterior y que carece del exón 3. Resultados

similares fueron obtenidos en células N2a, GT 1-7 y HEK-293. Además, a diferencia de los resultados obtenidos en muestras humanas (Haug *et al.*, 2003), no se encontraron diferencias significativas en la proporción de ambos productos en cualquiera de las líneas celulares transfectadas con los minigenes que simulaban ya sea al gen mutado o al tipo silvestre. No es posible establecer si los resultados obtenidos con esta aproximación son representativos de los mecanismos de **splicing** que ocurren *in vivo*, ya que no se puede descartar una posible modulación del proceso por factores ubicados en secuencias río arriba o río abajo en el gen y que no están incluidas en los minigenes. Por otro lado, tampoco se puede dejar de lado la posibilidad que factores tejido específico en neuronas, regulen el proceso localmente. Sin embargo, el hecho de que el **splicing** correcto ocurra en tres tipos celulares, dos de los cuales son de origen neuronal, permite suponer que mecanismos similares aplicarían tanto para los productos de los minigenes en las líneas celulares como los que ocurren en tejidos nativos. De acuerdo a lo anterior, podríamos suponer que no hay diferencias en la forma en que los productos del gen mutado y el tipo silvestre son tratados por la maquinaria del **splicing**. No existe una explicación simple para la discrepancia entre los resultados obtenidos por Haug y colaboradores (2003) y los resultados obtenidos a partir de los experimentos con minigenes. Salvo que esta discrepancia sea secundaria a diferencias metodológicas, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que no existirían diferencias en la forma en que el mRNA de hCIC-2 es procesado entre los individuos normales y los que llevan la mutación, alejando así la posibilidad de un rol patogénico simple jugado por ésta.

8.2 Evaluación funcional de hCIC-2 Δ 74-117

El procesamiento diferencial del mRNA para hCIC-2 predice que un salto en el exón 3 daría lugar a una proteína que carecería de casi la totalidad de la α -hélice B. Con el objetivo de realizar un análisis funcional de la proteína hipotética, se generó una construcción de esta (hCIC-2 Δ 74-117) la que luego fue expresada en células HEK-293. Los resultados provenientes de estos experimentos demostraron falta de función de hCIC-2 Δ 74-117 pues no se registraron corrientes atribuibles a su apertura. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Haug y colaboradores (2003) los cuales, utilizando una aproximación similar, vieron que esta proteína no es funcional.

La deleción de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* co-segrega en pacientes con ciertos tipos de EIG en una forma autosómica dominante. En estos casos la presencia de solo un alelo mutado es condición necesaria y suficiente para el desarrollo del fenotipo. El alelo mutado puede llevar a una ganancia o pérdida de función de la proteína dado por un mecanismo de haploinsuficiencia o de efecto dominante negativo. Para evaluar esta última posibilidad, se co-expresó hCIC-2 Δ 74-117 y hCIC-2 Wt en células HEK-293 para su análisis funcional mediante la técnica de **patch clamp**. Estos experimentos demostraron que ni la dependencia de potencial ni la amplitud de las corrientes del canal tipo silvestre se vieron afectadas por su co-expresión con el canal mutado. La evidencia expuesta anteriormente sugiere entonces que hCIC-2 Δ 74-117 no ejercería un efecto dominante negativo sobre hCIC-2 Wt. Estos resultados contrastan con

aquellos obtenidos por Haug y colaboradores (2003), los cuales demostraron un efecto dominante negativo de la proteína mutada sobre la expresión del canal tipo silvestre.

8.3 Localización subcelular de hCIC-2 Δ 74-117

Dado los resultados provenientes del análisis funcional de hCIC-2 Δ 74-117 y de los experimentos de co-expresión con el canal tipo silvestre nos planteamos la siguiente pregunta, ¿cuál es la razón de la falta de función y el nulo efecto dominante negativo que presenta Δ 74-117?. Una explicación plausible para este cuestionamiento podría surgir del análisis de los posibles destinos para la proteína, que incluirían su eliminación en los puntos de control de calidad durante su biogénesis y tráfico permaneciendo en compartimientos intracelulares, y su llegada a la membrana plasmática. Para establecer la localización subcelular de las proteínas de fusión hCIC-2 Wt y Δ 74-117 acopladas a GFP se utilizó microscopía confocal y una aproximación de doble tinción con dichas construcciones y di-8 ANEPPS. El estudio de hCIC-2 Wt GFP demostró un patrón de distribución complejo, encontrándose cantidad abundante de la proteína intracelularmente en estructuras vesiculares. Además, este presenta marca en la membrana plasmática, revelado por superposición con di-8-ANEPPS, lo que sugiere que CIC-2 se localizaría en áreas discretas de la membrana plasmática. La distribución de hCIC-2 Wt GFP en células HEK-293 es similar a la observada por experimentos de inmunofluorescencia realizados en células COS7, las cuales expresan CIC-2 endógenamente. Estos experimentos demostraron que la distribución de la proteína estaría circunscrita a la membrana plasmática, endosomas tempranos y zona

perinuclear (Dhani *et al.*, 2003), lo cual es consistente con los resultados observados en este estudio.

En contraste a la distribución subcelular observada para el canal tipo silvestre, la distribución de la proteína de fusión hCIC-2 $\Delta 74-117$ GFP demostró ser enteramente intracelular, reticular en apariencia y no tuvo una superposición obvia con la marca para di-8-ANEPPS. Los resultados anteriores sugieren que tanto la falta de función como el nulo efecto dominante negativo de $\Delta 74-117$ se debería a que no llega a la membrana plasmática. Estos difieren de aquellos obtenidos por Haug y colaboradores (2003) los cuales estudiaron el punto por transfección de proteínas de fusión acopladas a la proteína fluorescente amarilla y microscopía confocal. Su interpretación de los datos provenientes de estos experimentos fue que la proteína mutada llega a la membrana plasmática, explicando la pérdida de función y el efecto dominante negativo por un menoscabo en la función del canal. Sin embargo, es difícil distinguir la verdadera localización de la proteína en la membrana debido a la presencia de fluorescencia intracelular cercana a ésta y a que los autores no muestran estudios de co-localización.

El patrón de distribución subcelular observado para hCIC-2 $\Delta 74-117$ podría ser explicado en base al hecho de que se ha descrito (Trombetta & Parodi, 2003) que los mecanismos de control de calidad en el retículo endoplasmático tratan con muchas condiciones que resultan en conformaciones proteicas no nativas o alteradas, conduciendo a su retención en el retículo endoplasmático y posterior degradación.

Haug y colaboradores (2003) han propuesto un efecto dominante negativo para la mutante hCIC-2 $\Delta 74-117$. A pesar de que los experimentos funcionales demostraron que esta carece de función y aunque podría ser posible que la presencia de la mutante

podiese alterar el tráfico del canal tipo silvestre, previniendo de esta forma su acceso a la membrana, no se encontró ninguna evidencia para un efecto dominante negativo en los experimentos de co-transfección. Además, los experimentos con minigenes sugieren que la mutante $\Delta 74-117$ se produciría de manera similar tanto desde el gen tipo silvestre como de aquel con la delección.

Las consecuencias de la delección de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* asociada con EIG solo pueden ser especuladas. Esto debido en gran parte al hecho de que la función normal de CIC-2 en el cerebro aun no ha sido dilucidada. En neuronas CIC-2 se postula como un canal que contribuye a prevenir una acción excitatoria mediada por la apertura del receptor de GABA_A (Staley *et al.*, 1996), mientras que en astrocitos se propone un rol en la homeostasis del cloruro extracelular (Sik *et al.*, 2000). Una disfunción de cualquiera de estos dos procesos podría llevar a una alteración en la regulación de la excitabilidad neuronal y podría explicar el fenotipo epiléptico. La ausencia del fenotipo en el ratón ***knock-out*** para CIC-2 (Bösl *et al.*, 2001), el cual no demostró la generación de convulsiones espontáneas y que además revelo una degeneración de los fotorreceptores y de las células germinales masculinas, hace difícil postular una explicación directa para la relación entre la mutación y el mecanismo patofisiológico. Sin duda los modelos ***knock out*** son una poderosa herramienta para estudiar desarrollo, comportamiento y fisiología, además de ser útiles en el entendimiento de la naturaleza de enfermedades de origen genético. Sin embargo, problemas en la interpretación de estos modelos pueden provenir de factores tales como mecanismos compensatorios y diferencias en las características anatómicas y propiedades fisiológicas entre humanos y ratones. Por todo lo anterior no se pueden establecer aún conclusiones definitivas con

respecto a la función de CIC-2 en el cerebro y la relación de mutaciones en este canal con la patofisiología de la epilepsia.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no existe una relación simple entre la delección de 11 pb en el intrón 2 de *CLCN2* y la patofisiología de EIG. Esto se debe fundamentalmente a tres factores: (1) no se conoce con certeza la función de CIC-2 en el cerebro, (2) se han descrito una serie de variantes de **splicing** para CIC-2 (Chu *et al.*, 1996; Mladinic *et al.*, 1999; Loewen *et al.*, 2000; Cid *et al.*, 2000) las que se generan de manera natural sin que se conozca con exactitud el significado fisiológico de las mismas y (3) EIG tiene una herencia compleja en la cual unos pocos o muchos genes susceptibles interactúan para producir un síndrome epiléptico. De acuerdo a lo anterior *CLCN2* posiblemente sería uno de los genes susceptibles (uno de los genes que contribuirían al fenotipo) en los individuos que llevan esta mutación.

Finalmente, la exacta naturaleza fisiológica y celular de esta patología tiene que aguardar un conocimiento más profundo de la forma en que cada gen contribuye a un fenotipo epiléptico y la base genética sobre la cual el defecto se expresa.

9. LITERATURA CITADA

1. **Ault, B. & Hildebrandt, L.M.** (1994) GABA_A receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the rat isolated spinal cord-tail preparation. *Neuropharmacology*, 33, 109-114.
2. **Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Miltropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R. & LeGuern, E.** (2001) First genetic evidence of GABA (A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in gamma2-subunit gene. *Nat. Genet.*, 28, 46-48.
3. **Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J. & Steinlein, O.K.** (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, 279, 403-406.
4. **Bösl, 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 CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J.*, 20, 1289-1299.
5. **Chen, T.Y. & Miller, C.** (1996) Nonequilibrium gating and voltage dependence of the CIC-0 Cl⁻ channel. *J. Gen. Physiol.*, 108, 237 - 250.

6. **Chen, T.Y.** (1998) Extracellular zinc ion inhibits CIC-0 chloride channels by facilitating slow gating. *J. Gen. Physiol.*, 112, 715-726.
7. **Cherubini, E., Gaiarsa, J.L. & Ben-Ari, Y.** (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *TRENDS Neurosci.*, 14, 515-519.
8. **Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
9. **Chu, S., Murray, C.B., Liu, M.M. & Zeitlin, P.L.** (1996) A short CIC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucl. Acids Res.*, 24, 3453-3457.
10. **Cid, LP., Niemeyer, M.I, Ramirez, A. & Sepúlveda F.V.** (2000) Splice variants of CIC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am. J. Physiol.*, 279, 1198-1210.
11. **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.

- 12. Clayton, G.H., Staley, K.J., Wilcox, C.L., Owens, G.C. & Smith, R.L. (1998)** Developmental expression of ClC-2 in the rat nervous system. *Developmental Brain Research*, 108, 307-318.
- 13. Dhani, S.U., Mohammad-Panah, R., Ahmed, N., Ackerley, C., Ramjeesingh, M. & Bear, C.E. (2003)** Evidence for functional interaction between the ClC-2 chloride channel and retrograde motor dynein complex. *J. Biol. Chem.*, 16262-16270.
- 14. Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2002)** X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 415, 287-294.
- 15. Dutzler, R., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2003)** Gating Selectivity Filter in ClC Chloride Channels. *Science*, 300, 108-112.
- 16. Faustino, N.A. & Cooper, T.A. (2003)** Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development*, 17, 419-431.
- 17. Fahlke, C., Rhodes, T.H., Desai, R.R. & George, A.L. (1998)** Pore stoichiometry of a voltage-gated chloride channel. *Nature*, 394, 687-690
- 18. Golding, N.L. & Oertel D. (1996)** Context-dependent synaptic action of glycinergic and GABAergic inputs in the dorsal cochlear nucleus. *J. Neurosci.*, 16, 2208-2219.

- 19. Gründer, 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.
- 20. Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A.K., Sander, T., Ramírez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., Dullinger, J.S., Rau, B., Haverkamp, F., Beyenburg, S., Schulz, H., Janz, D., Giese, B., Müller-Newen, G., Propping, P., Elger, C.E., Fahlke, C., Lerche, H. & Heils, A.** (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.*, 33, 527-532.
- 21. Holmes, D.S. & Quigley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114, 193-197.
- 22. Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. & Zdebik, A.A.** (2001) Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol. Rev.*, 82, 503–568.
- 23. Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. & Yamada, H.** (1999) The CLC chloride channel family. *European Journal of Physiology*, 437, 783-795.
- 24. Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G.** (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocyte*. *Nature*, 348, 510-514.

- 25. Jordt, S.E. & Jentsch, T.J.** (1997) Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.*, 16, 1582–1592.
- 26. Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lechmann-Horn, F., Grzeschik, K.H. & Jentsch, T.J.** (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, 257, 797-800.
- 27. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Doyle, M. & FitzHugh, W.** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- 28. 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.
- 29. Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fischer, 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 disease. *Nature*, 379, 445-449.
- 30. Loewen, M.E., McDonald, D.W., Gaspar, K.J. & Forsyth, G.W.** (2000) Isoform-specific exon skipping in a variant form of ClC-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493, 248-288.

- 31. Lo Tuco, J.J., Owens, D. F., Heath, M.J.S., Davis, M.B.E. & Kriegstein, A.R.** (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 15, 1287-1298.
- 32. Ludewig, U., Pusch, M. & Jentsch, T.J.** (1996) Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature*, 383, 340-343.
- 33. Ludewig, U., Pusch, M. & Jentsch, T.J.** (1997) Independent gating of the single pores in ClC-0 chloride channels. *Biophys. J.*, 73, 789-797.
- 34. Malka, N.R. & Batsheva, K.** (2002) Splicing regulation as a potential genetic modifier. *TRENDS in Genet.*, 18, 123-127.
- 35. Middleton, R.E., Pheasant, D.J. & Miller, C.** (1996) Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature*, 383, 337-340.
- 36. Mlanidic, M., Becchetti, A., Didelon, F., Bradbury, A. & Cherubini, E.** (1999) Low expression of the ClC-2 chloride channel during postnatal development: a mechanism for the paradoxical depolarizing action of GABA and glycine in the hippocampus. *Proc. R. Soc. Lond.*, 266, 1207-1213.
- 37. Modrek, B. & Lee, C.** (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.*, 30, 13-19.

- 38. Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Zúñiga, L., Catalan, M. & Sepúlveda, F.V.** (2003) A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J. Physiol.*, 553, 873-879.
- 39. 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.
- 40. Olsen, R.W. & MacDonald, R.L.** (1994) GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 569-602.
- 41. Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. & Jentsch T.J.** (1995) Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature*, 373, 527-531.
- 42. Pusch, M., Ludewig, U. & Jentsch T.J.** (1997) Temperature dependence of fast and slow gating relaxation of ClC-0 chloride channel. *J. Gen. Physiol.*, 109, 105-116.
- 43. Rohrbough, J. & Spitzer, N.C.** (1996) Regulation of intracellular Cl⁻ levels by Ca²⁺ dependent Cl⁻ cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABA_A receptor-mediated responses in spinal neurons. *J. Neurosci.*, 16, 82-91.

- 44. Sander, T., Schultz, H., Saar, K., Gennaro, E., Riggio, M.C., Bianchi, A., Zara, F., Luna, D., Bulteau, C., Kaminska, A., Ville, D., Cieuta, C., Picard, F., Prud'homme, J.F., Bate, L., Sundquist, A., Gardiner, R.M., Janssen, G.A.M.A.J., de Haan, G.J., Kasteleijn-Nolst-Trenite, D.G.A., Bader, A., Lindhout, D., Riess, O., Wienker, T.F., Janz, D. & Reis, A. (2000) Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1465-1472.**
- 45. Scheffer, I.E. & Berkovic, S.F. (2003) The genetics of human epilepsy. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 24, 428-433.**
- 46. Sik, A., Smith, R.M. & Freund, T.F. (2000) Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience*, 101, 51-65.**
- 47. 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.**

- 48. 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.
- 49. Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A. & Ghetti, B. (1998)** Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 7737-7741.
- 50. Staley, K.J. & Mody, I. (1992)** Shunting of excitatory input to dentate gyrus granules cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. *J. Neurophysiol.*, 68, 197-212.
- 51. Staley, K. (1994)** The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.*, 72, 273-284.
- 52. Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C. & Jentsch, T.J. (1996)** Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron*, 17, 543-551.
- 53. Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M. & Jentsch, T.J. (1992)** A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*, 356, 57–60.

- 54. Thompson, S.M.** (1994) Modulation of inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *Prog. Neurobiol.*, 42, 575-603.
- 55. Trombetta, E.S. & Parodi, A.J.** (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 19, 649-676.
- 56. Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F. & Mulley, J.C.** (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat. Genet.*, 19, 366-370.
- 57. Weinreich, F. & Jentsch, T.J.** (2001) Pores formed by single subunits in mixed dimmers of different CLC chloride channels. *J. Biol. Chem.*, 276, 2347-2353.