



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Pablo Cid S.

Centro de Estudios Científicos

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Alejandro Reyes

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA
QUINASA SPAK CON EL CANAL DE CLORURO
gpCLC-2**

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

CAROLA JEANNETTE MATURANA FOURNIEL

VALDIVIA – CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado en las dependencias del Centro de Estudios Científicos de Valdivia (CECS), específicamente en el laboratorio de Biofísica y Fisiología Molecular, y fue financiada por el proyecto Fondecyt 1030627 y 1070722. Mi gratitud para todos los que forman parte de la tripulación y que imparten ciencia del más alto nivel.

ÍNDICE

1. Resumen	1
1.1. Summary	2
2. Introducción	3
2.1. Canal de Cloruro ClC potencialmente regulado por interacción proteína-proteína	4
2.2. Proteína quinasa SPAK es clave en la regulación del transporte de cloruro en epitelios	8
2.3. Propósito de este estudio	15
2.3.1. Hipótesis	15
2.3.2. Objetivo General	16
2.3.3. Objetivos Específicos.	16
3. Materiales y Métodos	17
3.1. Materiales	17
3.1.1 Reactivos	17
3.1.2. Equipos	20
3.2. Métodos	21
3.2.1. Generación de la proteína quinasa SPAK etiquetada con el epítipo HA.	21
3.2.1.1. Diseño de partidores	21
3.2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
3.2.1.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	22
3.2.1.4. Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T EASY	23
3.2.1.5. Transformación de células competentes	24
3.2.1.6. Purificación de DNA plasmidial por el método de pequeña escala	24

3.2.1.7. Doble digestión con enzimas de restricción	25
3.2.1.8. Purificación del DNA plasmidial por el método de minipreparación	26
3.2.1.9. Subclonamiento del fragmento de SPAK en el plasmidio pCR3.1-rSPAK	26
3.2.1.10. Purificación de DNA plasmidial por el método de midipreparación	27
3.2.1.11. Cuantificación de DNA plasmidial	28
3.2.2. Generación de proteínas recombinantes CR5-EGFP y CR1-F84H-EGFP.	29
3.2.2.1. Subclonamiento de la región variable de CR1 en el plasmidio pEGFP-N1-CR1	29
3.2.3. Generación de proteínas CR1, CR5 Y CR1-F84H etiquetadas al epítipo V5	30
3.2.3.1. Diseño de partidores	30
3.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
3.2.3.3. Subclonamiento del producto de PCR y la secuencia codificante de CR1 en el plasmidio pcDNA3.1-V5	31
3.2.3.4. Subclonamiento de la región variable de CR1 en el plasmidio pcDNA3.1-V5-CR1	32
3.2.4. Generación de proteínas recombinantes CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP	33
3.2.4.1. Subclonamiento de la secuencia de gpClC-2 en el plasmidio pECFP-N1	33
3.2.5. Generación de la proteína recombinante YFP-SPAK.	34
3.2.5.1. Diseño de partidores	34
3.2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
3.2.5.3. Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T	35
3.2.5.4. Subclonamiento del fragmento de SPAK en el plasmidio pEYFP-C1-rSPAK	35
3.2.6. Cultivo celular	36
3.2.7. Transfección transitoria	37
3.2.8. Fijado de células	38

3.2.9. Inmunofluorescencia	38
3.2.10. Microscopía confocal	39
3.2.11. Transfección transitoria para estudio de proteínas	40
3.2.11.1. Preparación de extractos totales	40
3.2.11.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3.2.11.3. Electrotransferencia de proteínas	42
3.2.11.4. Inmunotinción de electrotransferidos e identificación de proteínas	43
3.2.12. Estudio de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> mediante co-inmunoprecipitación	44
3.2.13. Estudio de interacción proteína-proteína <i>in vivo</i> mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)	45
3.2.13.1. Plasmidios utilizados	45
3.2.13.2. Co-transfecciones	45
4. Resultados	47
4.1. Generación de proteína SPAK etiquetada con el epitopo HA y proteínas recombinantes CR5-EGFP y CR1 F84H-EGFP.	47
4.2. Generación de proteínas recombinantes CR1-CFP, CR5-CFP, CR1-F84H-CFP y EYFP-SPAK.	53
4.3. Estudios de localización celular en línea celular HEK-293	59
4.3.1. Localización de las proteínas CR1-GFP, CR5-GFP y CR1-F84H-GFP	59
4.3.2. Inmunolocalización de la proteína SPAK-HA	59
4.3.3. Co-detección de CR1-EGFP y SPAK-HA	61
4.4. Estudio de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> mediante co-inmunoprecipitación	64

4.5. Estudio de interacción proteína-proteína <i>in vivo</i> mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)	77
4.6. Planteamiento de una nueva estrategia	101
4.6.1. Generación de proteínas CR1, CR5 y CR1-F84H etiquetadas con el epítipo V5	101
5. Discusión	111
5.1. Interpretación de los resultados	116
5.2. Proyección del trabajo	121
Anexos	
Anexo A	122
Anexo B	123
6. Literatura citada	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Alineamiento de las secuencias del amino terminal de ClC-2	7
Figura 2: Familia de quinasas tipo STE-20 de humano y <i>C. elegans</i>	9
Figura 3: Esquema de los motivos de unión reconocidos por SPAK	11
Figura 4: Representación esquemática de SPAK	12
Figura 5: Esquema del procedimiento de subclonamiento del fragmento codificante de SPAK fusionado a HA, en el vector de expresión pCR3.1	48
Figura 6: Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pGEM-T Easy-SPAK-HA	49
Figura 7: Esquema del procedimiento de subclonamiento del fragmento variable de CR1, en el vector de expresión pEGFP-N1-CR1	50
Figura 8: Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1-CR5 y pEGFP-N1-CR1-F84H	52
Figura 9: Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1-CR1, pCR3.1-CR1, pCR3.1-CR5, pCR3.1-CR1-F84H y pEGFP-N1	54
Figura 10: Esquema del procedimiento de subclonamiento de CR5 en el vector de expresión pEGFP-N1	56
Figura 11: Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pEGFP-N1-SPAK	58
Figura 12: Localización celular de CR1-EGFP, CR5-EGFP y F84H-EGFP en la línea celular HEK-293	60
Figura 13: Inmunolocalización de la proteína SPAK-HA	62

Figura 14: Co-detección de CR1 y SPAK	65
Figura 15: Análisis de Western blot de SPAK-HA, CR1-GFP, CR5-GFP y CR1-F84H-GFP	66
Figura 16: Análisis de Western blot de prueba para los tampones de lisis	68
Figura 17: Análisis de Western blot para la evaluación de las condiciones de denaturación de proteínas y tampón de corrida	71
Figura 18: Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de SPAK y CR-1	74
Figura 19: Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de SPAK, CR1 y CR5	76
Figura 20: Localización celular de CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP en la línea celular HEK-293	78
Figura 21: Localización celular de EYFP-SPAK en la línea celular HEK-293	81
Figura 22: Espectro de excitación de las construcciones EYFP-SPAK y CR1-ECFP	83
Figura 23: Espectro de excitación de HEK-293 en el canal YFP (535) y en el canal CFP (480)	86
Figura 24: Intensidad de Fluorescencia versus Tiempo de exposición.	91
Figura 25: Espectros de excitación de EYFP-SPAK/ CR1-ECFP en el canal YFP CFP	94
Figura 26: Espectros de excitación de EYFP-SPAK/ CR5-ECFP en el canal YFP y CFP	98
Figura 27: Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pcDNA3-V5-hClC-2	103
Figura 28: Digestión con enzimas de restricción del vector pEGFP-N1-CR1	104
Figura 29: Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1–CR5, pEGFP-N1–CR1-F84H y pcDNA3.1-V5-CR1	105
Figura 30: Localización celular de CR1-V5, CR5-V5 y CR1-F84H-V5 en la línea celular HEK-293	107
Figura 31: Análisis de Western blots de CR1-V5, CR5-V5 y CR1-F84H-V5	108

Figura 32: Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de CR1-V5 y CR5-V5	110
Figura 33: Secuencia de la proteína fluorescente verde silvestre	118
Figura A: Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de Task-2	122
Figura B.1: Análisis de Western blot para determinar reacción inespecífica	124
Figura B.2: Dot blot del anticuerpo anti-IgG de ratón	125
Figura B.3: Análisis de Western blot para evaluar título del anticuerpo preabsorbido	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Detalle de la composición de cada tampón de lisis	67
Tabla 2: Detalle de la composición de cada tampón de corrida	70
Tabla 3: Descripción de los tampones de lavado	73
Tabla 4: Porcentaje de contaminación cruzada o <i>bleed-through</i> de EYFP-SPAK	92

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CIC-2	Canal de cloruro 2
CFP	Proteína fluorescente ciano
HEK-293	Células embrionarias de riñón humano 293
DO ₂₆₀	Densidad óptica medida a 260 nm
DOC	Desoxicolato de sodio
DMEM	Medio de cultivo Tagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxi nucléotidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilidendiamonotetracético
EGTA	Etilen glicol-bis(β-aminoetil eter)- N,NN',N'- Tetracido acético
FRET	Tranferencia de energía de resonancia de fluorescencia
GFP	Proteína fluorescente verde
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
n	Número de experimentos
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RNasa	Ribonucleasa
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Lauril sulfato de sodio
TBS	Tampón Tris salino
TBS-T	Tampón tris salino-tween 20
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris [hidroximetil]aminometano
U	Unidades enzimáticas
U.A.	Unidades arbitrarias
UV	Ultra violeta
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-beta-D-galactosido
YFP	Proteína fluorescente amarilla

1. RESUMEN

El canal ClC-2 pertenece a la familia de transportadores y canales de cloruro ClC. Se expresa en diversos tejidos, pero su papel fisiológico aún es materia de estudio. En el colon, se expresa en la superficie celular y se postula que participa en la absorción de electrolitos y fluidos. Existe una variante de empalme (*splicing*), carente de diez aminoácidos en el extremo amino terminal, que origina un canal con cinética de cierre rápida. En esta región existe un motivo de consenso de unión a la proteína quinasa SPAK (*Ste20-related proline alanine-rich kinase*). Esta proteína quinasa modula proteínas relacionadas con el transporte transepitelial de NaCl. Estudios electrofisiológicos de mutaciones en el motivo de unión obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la cinética de cierre del canal es influida por la interacción del canal con SPAK.

Con el objetivo de evaluar dicha interacción se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y FRET. Estos experimentos no discriminaron entre la variante de empalme y el canal completo. El análisis de las secuencias de la EGFP y sus variantes utilizadas en este trabajo demostraron la presencia de un supuesto motivo de unión a SPAK que explicaría los resultados. Alternativamente realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación, utilizando el epítipo V5 fusionado al carboxilo terminal del canal, pero no logramos demostrar interacción de proteínas. Estos resultados podrían ser falsos negativos debido a la falta de estandarización de las condiciones de ensayo con el nuevo anticuerpo o que la interacción entre las proteínas es débil. Como alternativa a que la interacción no exista, los efectos funcionales observados podrían ser explicados por cambios conformacionales del segmento amino terminal de la proteína, secundario a las mutaciones.

1.1. SUMMARY

CLC-2 is a member of the CLC family of chloride transporter and channels. It is expressed in different tissues, but its physiological role is still subject of study. In colon, is expressed in the surface of the cells, and it is postulated that is involved in the electrolytes and fluids absorption. There is an alternative splicing, which lack of ten amino acids at the amino terminal of the protein, which render a channel with faster closing kinetic. In this amino acid region there is a consensus motive that can bind SPAK protein kinase (Ste20-related proline alanine-rich kinase). This kinase protein modulates NaCl transepithelial transport-related proteins. Previous electrophysiological studies of mutants in the binding motive studies in our laboratory suggest that the closing kinetics channel is influenced by the SPAK interaction with the channel.

In order to characterize the interactions, co-immunoprecipitación and FRET assays were performed. These experiments demonstrated interaction with the kinase but it could not distinguish between both splicing variants of the full channel. The sequences analysis of the EGFP and its variants used in this work demonstrated the presence of a putative SPAK binding motive explaining the results. Alternatively we perform co-immunoprecipitación assays, using a V5 epitope attach to the carboxy terminal of the channel and we did not find protein interaction. These results could be false negative due to a lack of standardization of assay conditions with the new antibody or that the interaction between the proteins is weak. Alternatively the interaction does not exist and the functional effects observed are explained by conformation change in the of amino-terminal segment of the protein secondary to the mutations.

2. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo pasivo de iones a través de diversas membranas biológicas. Pueden ser selectivos para un tipo particular de ion y aún mantener una alta tasa de transporte (Jentsch, 2002; Nillus & Droogmans, 2003). Los canales se han clasificado de acuerdo al tipo principal de ión que permea a través de sus poros, los que pueden ser iones sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{+2}) o cloruro (Cl^-), y en algunos casos no tan selectivos, permitiendo el paso de cationes o aniones. Más recientemente se han comenzado a clasificar en función de su secuencia molecular (Valverde, 1999; Jentsch, 2002; Nillus & Droogmans, 2003).

Los canales aniónicos forman poros en la membrana plasmática y membranas intracelulares, siendo permeables a varios tipos de aniones, pero se denominan canales de Cl^- , ya que es el cloruro el anión más abundante a nivel fisiológico (Nillus & Droogmans, 2003). Los canales de Cl^- se expresan ubicuamente y se encuentran en todas las células eucarióticas, en células de origen vegetal, protozoos, bacterias y hongos, en una amplia variedad de tejidos; incluyendo tejido muscular, nervioso, endocrino, exocrino y epitelial (Valverde, 1999). Los canales de cloruro son esenciales para ejecutar una amplia gama de funciones celulares. Tienen un papel fundamental en procesos fisiológicos tales como regulación del volumen celular, el transporte epitelial, la excitabilidad neuronal y muscular y la regulación del pH intracelular, manteniendo así la homeostasis celular. La disfunción de estos canales conlleva a alteraciones en la función de muchos órganos, causando enfermedades tales como fibrosis quística, epilepsia, miotonías, etc (Jentsch *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista funcional y atendiendo al mecanismo primario de activación, se han descrito distintos tipos de canales de Cl^- : (1) los que dependen de los cambios en el potencial de membrana (canales de Cl^- dependientes de voltaje o tipo CLC); (2) los canales sensibles a cambios en el volumen celular (canales aniónicos regulados por volumen); (3) los activados por proteínas quinasas/nucleótidos, como el canal mutado en la fibrosis quística (CFTR); (4) los dependientes de un incremento en el canal Ca^{+2} intracelular (canales de Cl^- activados por Ca^{+2} , CaCC); (5) y los canales de Cl^- activados por ligandos o asociados a receptores (receptores GABA o glicina) (Valverde, 1999; Nillus & Droogmans, 2003).

2.1. Canal de Cloruro ClC potencialmente regulado por interacción proteína-proteína

El primer miembro de la familia de canales de cloruro tipo CLC fue inicialmente identificado mediante clonamiento por expresión desde el órgano eléctrico del *Torpedo marmorata* y se denominó ClC-0 (Jentsch *et al.*, 1990). En mamíferos, esta familia se encuentra conformada por nueve miembros, los que se clonaron por homología a ClC-0. ClC-1, ClC-2, ClC-Ka y ClC-Kb son canales de cloruro que se encuentran en la membrana plasmática; ClC-3 es probablemente un canal ubicado en organelos intracelulares pero también puede estar ubicado en la membrana plasmática (ClC-3B); mientras que ClC-4, ClC-5, ClC-6 y ClC-7 se cree que residen predominantemente en membranas intracelulares.

El canal ClC-2 fue clonado por homología desde genotecas de corazón y cerebro de rata y comparte un 50% de similitud con ClC-0 y ClC-1 (Thiemann *et al.*, 1992). Es una proteína integral de membrana, de aproximadamente 99 kDa, con una topología de membrana similar

al resto de los miembros de esta familia. Presenta 17 dominios de transmembrana, con los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el espacio intracelular, y la presencia de dos motivos CBS (Cistationina- β sintasa) en el extremo carboxilo terminal (Jentsch *et al.*, 1990, Steinmeyer *et al.*, 1991, Schmidt-Rose and Jentsch, 1997).

Por análisis de *Northern blot*, se ha determinado su expresión en tejido cardíaco, cerebro, pulmón, riñón, páncreas, estómago, intestino, hígado, así como en las líneas celulares T84 y Caco-2 (derivadas de intestino humano), Hela, CHO, Neuro-2A, A10, COS, PC-12 (Thiemann *et al.*, 1992). En condiciones de reposo este canal permanece cerrado, sin embargo se observa una activación lenta a potenciales hiperpolarizantes, presentando una secuencia de selectividad aniónica del tipo $\text{Cl}^- \geq \text{Br}^- \geq \text{I}^-$ (Thiemann *et al.*, 1992). Además del potencial, el canal recombinante se activa por aumento en la concentración del cloruro intracelular (Pusch *et al.*, 1999, Catalán *et al.*, 2004), por acidificación del pH extracelular, alcanzando mayor activación a pH 6,5 (Jordt and Jentsch, 1997) y aumentos en el volumen celular secundario a shock hipotónico (Gründer *et al.*, 1998). Sin embargo, la acción del pH extracelular es dual, ya que el canal se inhibe a pH menores a 6,5 (Arreola *et al.*, 2002).

La amplia distribución del canal en distintos tejidos y tipos celulares ha sido verificada tanto por técnicas de biología molecular, inmunodetección y por electrofisiología. Estas corrientes nativas tipo ClC-2, son bloqueadas por cationes divalentes, especialmente por cadmio, por pH alcalino y pH ácido menor a 6,5. Se desarrollan con una activación lenta sólo a potenciales hiperpolarizantes, mientras que a potenciales despolarizantes el canal no se abre, lo que hace que el ClC-2 sea un rectificador de entrada. Para un canal de cloruro esto significa que permite la salida del ión desde el espacio intracelular, o el ingreso del cloruro hacia el interior de un organelo, dependiendo de la localización del canal.

Su conformación, predicha a partir de la estructura primaria, no difiere de la descrita para otros canales ClC; sin embargo, se ha encontrado al menos dos formas de empalme alternativo para el mRNA de ClC-2, que dan origen a canales no funcionales (Chu y Zeitlin, 1997). Una tercera variante de empalme, carente de diez aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína del cobayo (aminoácidos 77 al 86) denominada CR5, origina un canal funcional (Cid *et al.*, 2002). Sin embargo, desde el punto de vista electrofisiológico esta variante de empalme difiere en la cinética de cierre, siendo más rápida que la variante que posee los 10 aminoácidos denominada CR1.

Posibles explicaciones a la diferencia en el comportamiento cinético podrían ser que la falta de los diez aminoácidos implique una pérdida de interacciones con elementos moduladores o que se genere un cambio en la conformación de la proteína.

De acuerdo a lo anterior la existencia de una secuencia de consenso de unión a la proteína quinasa SPAK (*Ste20 related proline-alanine-rich kinase*) en el amino terminal de algunos canales ClC-2 sugiere que estas proteínas podrían interactuar. Este motivo de interacción se encuentra en CR1, ClC-2 de ratón, conejo y humano, no así en el de *Drosophila melanogaster*. La variante de *splicing* CR5, no posee la secuencia motivo de unión, ya que la delección de diez aminoácidos en el amino terminal, incluye este segmento de interacción (figura 1).

Con el objeto de estudiar posibles cambios funcionales relacionados con este sitio se realizaron mutaciones sitio dirigidas y estudios electrofisiológicos en nuestro laboratorio. Se cambió la fenilalanina 84 de la secuencia de CR1 por histidina (CR1-F84H) y se encontró que el canal mutante se cierra más rápido. El canal de *D. melanogaster* el cual posee una histidina en vez de la fenilalanina en el motivo de la interacción tiene un cierre más rápido que CR5. El cambio de aminoácidos que restablece el sitio de interacción (H por F) provocó que el canal de

		1		50
gpClc-2(CR1)	(1)	-----MAASAAAAGEGMEPRALQYEQTLMYGRYTQELGAFAKEEAARIR		
gpClc-2(CR5)	(1)	-----MAASAAAAGEGMEPRALQYEQTLMYGRYTQELGAFAKEEAARIR		
hClc-2	(1)	-----MAAAAEEGMEPRALQYEQTLMYGRYTQDLGAFAKEEAARIR		
mClc-2	(1)	MAAATAAAAAAAGEGMEPRALQYEQTLMYGRYTQELGAFAKEEAARIR		
rClc-2	(1)	--MAAATAAAATVAGEGMEPRALQYEQTLMYGRYTQELGAFAKEEAARIR		
dmClc-2	(61)	KEQQRKQSIEIDPPGDDKNQIEIEIEAFYYMYGRYTKDLGEFAKDEARKLK		
		45		100
gpClc-2(CR1)	(45)	LGGPEPWKGPPSPRVPPELLEYGQSRCAPCCICSVRCHKFLVSRVGEDWI		
gpClc-2(CR5)	(45)	LGGPEPWKGPPSPRVPPELLEYGQSRCAPCC-----SRVGEDWI		
hClc-2	(43)	LGGPEPWKGPPSSRAAPELLEYGRSRCARCRVCSVRCHKFLVSRVGEDWI		
mClc-2	(51)	LGGPEPWKGSPSARATPELLEYGQSRCARCRICSVRCHKFLVSRVGEDWI		
rClc-2	(49)	LGGPEPWKGSPSARATPELLEYGQSRCARCRICSVRCHKFLVSRVGEDWI		
dmClc-2		--ILEKRRKQEDKQRNKELL---GKHSTQAKRVSSWIWRHTVARLGEDWV		
			*	
		95		144
gpClc-2(CR1)	(95)	FLVLLGLLMALVSWAMDYAIIVCLQAQQWMSQGLNTNILLQYLAWVTYPV		
hClc-2(CR5)	(93)	FLVLLGLLMALVSWVMDYAIIVCLQAQQWMSRGLNTSILLQYLAWVTYPV		
mClc-2	(101)	FLVLLGLLMALVSWAMDYAIIVCLQAQQWMSRGLNTNILLQYLAWVTYPV		
rClc-2	(99)	FLVLLGLLMALVSWAMDYAIIVCLQAQQWMSRGLNTNILLQYLAWVTYPV		
dmClc-2		FLALLGIIMALLSFIMDKGISICTNARIWLYRDLTSQPFVQYIAWVSLPV		

Figura 1. Alineamiento de las secuencias del amino terminal de Clc-2. Enmarcado se muestra el putativo sitio de unión de SPAK (secuencia consenso R/K-F-X-V/I). Se muestran las secuencias de cobayo (gpClc-2 en sus variantes CR1 y CR5), humano (h), ratón (m), rata (r) y drosófila (Dm). (*) destaca el cambio H por F.

D. melanogaster se cerrara más lento (figura 1). En consecuencia, bajo la premisa de que existe un motivo de unión en ClC-2, que variaciones en esta secuencia afectan concordantemente la cinética de cierre del canal y que existen otras proteínas que se expresan en epitelios e interaccionan directamente con SPAK afectando en su actividad (ver mas adelante) ameritaron el estudio de una posible interacción directa entre estas proteínas.

2.2. Proteína quinasa SPAK es clave en la regulación del transporte de cloruro en epitelios.

Las proteínas trans-membrana que transportan iones a través de membranas biológicas son reguladas a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccionalmente. La regulación transcripcional y traduccional de las proteínas generalmente son de larga duración y estacionaria, mientras que la modificación post-traduccionales de las proteínas son rápidas y transitorias. Una de las modificaciones post-traduccionales más importantes que ocurre en la célula es la fosforilación reversible de proteínas específicas por enzimas conocidas como proteínas quinasas (Adams, 2001). Las proteínas quinasas constituyen una de las más grandes familias de genes en eucariontes (Manning *et al.*, 2002), que regulan un amplio repertorio de procesos fisiológicos (transporte de iones, respuesta a receptores, biosíntesis de neurotransmisores, trafico de organelas, transcripción y replicación de ADN y diferenciación celular) (Adams, 2001).

Existen más de treinta proteínas quinasas identificadas en mamíferos relacionadas a la proteína quinasa *sterile 20* de *Saccharomyces cerevisiae* (Ste20p). En 1991, Dan *et al.*, dividió las quinasas de mamífero relacionadas a Ste20p en dos subgrupos: quinasas activadas por p21 (PAKs, dos subfamilias), las cuales se caracterizan por tener su dominio catalítico en el carboxilo

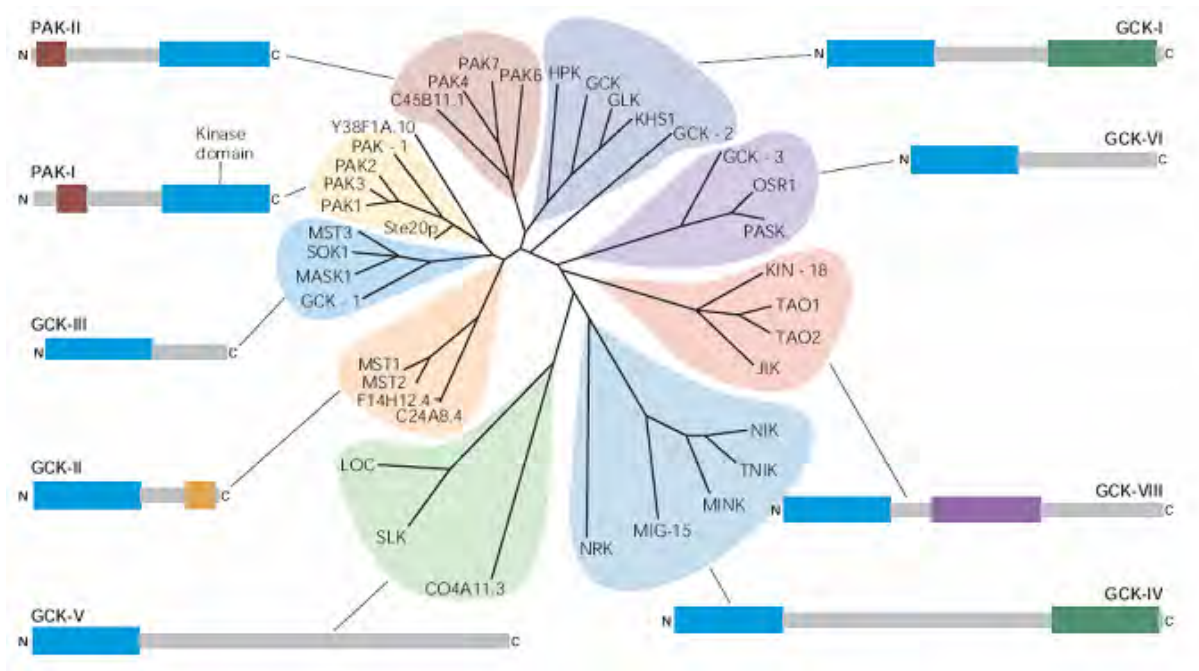


Figura 2. Familia de quinasas tipo STE-20 de humano y *C.elegans*. Agrupados de acuerdo al grado de homología, con respecto a la ubicación del dominio catalítico (rectángulo azul). Se indica el dominio PAK presente solo en los miembros de la familia quinasas PAK, de unión a miembros de la familia p21 y Rho (cuadro café); dominio SARAH facilita la dimerización y es único en la familia GCK-II (cuadro naranja); dominio Citron-like involucrado en la interacción con macromoléculas, particularmente GTPasas (rectángulo verde); dominio DUF334 solo se ha encontrado en la subfamilia GCK-VIII y su función aún es desconocida (rectángulo púrpura) (Strange *et al.*, 2006).

terminal, y las quinasas de centro germinal (GCKs, ocho subfamilias), las cuales tienen su dominio catalítico localizado en el amino terminal (Dan *et al.*, 2001).

La subfamilia GCK-VI comprende tres quinasas: PASK o el homólogo en rata SPAK (*Ste20-related proline alanine-rich kinase*) (Ushiro *et al.* 1998; Johnston *et al.* 2000; Miao *et al.*, 2000), OSR1 (*oxidative stress response 1*) y GCK-3. Estas quinasas poseen una región carboxilo terminal única, corta y bien conservada (figura 2).

Se ha demostrado que la región carboxilo terminal corresponde al dominio que interacciona con el motivo RFXV (Figura 3) en proteínas tales como cotransportadores cation-cloruro (Piechotta *et al.*, 2002) y canales de cloruro (Denton *et al.*, 2005). Se ha visto que además se asocia con otras proteínas, como proteína del *shock* térmico 105 (HSP105), WNK4 (With No Lisina (K)) (Piechotta & Delpire, 2002; Piechotta *et al.*, 2003), tirosina quinasa asociada a apoptosis (AATYK), gelsolina (Piechotta *et al.*, 2003), actina del citoesquelto (Tsutsumi *et al.*, 1989) y p38 MAPK (Johnston *et al.*, 2000).

La proteína quinasa SPAK posee un dominio catalítico en el extremo amino terminal, localizado desde el residuo aminoacídico 72-346, el cual contiene once subdominios conservados característicos de las quinasas S/T (Ushiro *et al.*, 1998), que fosforilan residuos serina/ treonina. Río arriba del dominio catalítico existe una secuencia de repeticiones prolina-alanina (PAPA box) (Johnston *et al.*, 2000; Piechotta *et al.*, 2002). Dentro del dominio regulatorio localizado en el extremo carboxilo terminal existe una región ácida que contiene una secuencia de consenso (DEMDE), motivo de reconocimiento de clivaje para las caspasas (Ushiro *et al.*, 1998) (Figura 4).

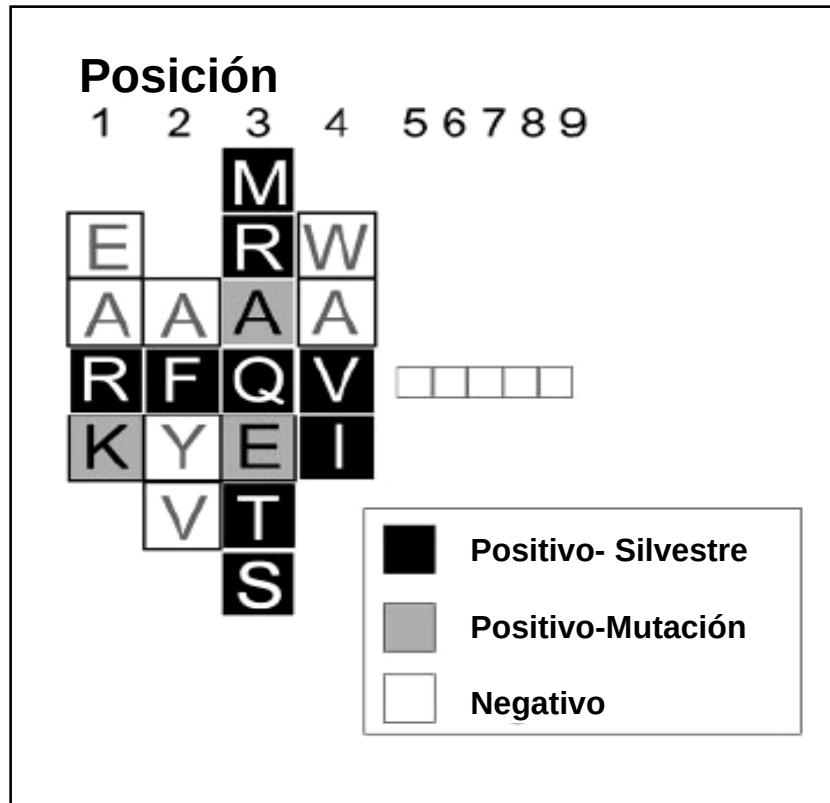


Figura 3. Esquema de los motivos de unión reconocidos por SPAK. Cada cuadro representa la posición de los nueve aminoácidos presentes en el motivo de unión. Los aminoácidos fueron analizados por mutaciones puntuales de KCC3, KCC1 y KCC2. Los cuadros negros y grises representan los aminoácidos que promueven la interacción y los cuadros blancos representan aminoácidos mutados que pierden la interacción (Piechotta *et al.*, 2002).



Figura 4. Representación esquemática de SPAK. En el extremo amino terminal se muestran las repeticiones prolina-alanina (PAPA box), dentro del dominio catalítico se indica la posición de la mutación puntual del dominante negativo (K104R). En el dominio regulatorio son indicados el sitio de clivaje para las caspasas y la región de interacción proteína-proteína (Gagnon *et al.*, 2006).

La distribución de la proteína quinasa SPAK se ha examinado ampliamente por análisis de Northern y Western blot (Ushiro et al., 1989; Johnston et al., 2000), hibridación *in situ* (Miao et al., 2000) y análisis de inmunohistoquímica (Piechotta *et al.*, 2002, 2003). Colectivamente estos estudios demostraron una alta expresión de SPAK en neuronas (raíz dorsal, ganglio coclear) y epitelios (plexo coroideo, epitelio renal, glándula salivares, células parietales en glándula fúndica y el estómago). Interesantemente, estos patrones de expresión son los mismos que se obtienen para NKCC1, el cual se expresa en altos niveles en el plexo coroideo, glándula salivares (Piechotta *et al.*, 2002), células parietales (Piechotta *et al.*, 2003) y glándula coclear (Delpire *et al.*, 1999), sugiriendo que SPAK se expresa preferentemente en tejidos de transporte activo de iones.

Funcionalmente, SPAK incrementa la actividad del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC1) (Dowd & Forbush, 2003; Gagnon *et al.*, 2005), reduce la actividad del cotransportador K-Cl (NCC2) (Gagnon *et al.*, 2005) e inactiva el canal de iones ClC dependiente del ciclo celular en *Caenorhabditis elegans* (Denton *et al.*, 2005).

La actividad de los cotransportadores catión-cloruro: Na-K-2Cl y Na-Cl, son regulados por fosforilación/defosforilación (Flatman, 2002; Lauf & Adragna, 2000; Russell, 2000). Aunque la regulación es en direcciones opuestas, ambos cotransportadores tienen vías regulatorias comunes. Los factores que activan un transportador usualmente inhiben el otro, y vice-versa. Es así como el cotransportador Na-K-2Cl es activado por la reducción del volumen celular e inhibido por un aumento del volumen celular, mientras que el cotransportador K-Cl es activado por un aumento celular e inhibido por un encogimiento celular (Gagnon *et al.*, 2005).

Delpire y colaboradores identificaron una interacción proteína-proteína de SPAK con el extremo amino terminal de NKCC y KCC vía motivo de unión a SPAK [(R/K)FX(V/I)]

(Piechotta *et al.*, 2002). La sobreexpresión de la mutante dominante negativa de SPAK en células embrionarias de riñón humano (HEK-293) reduce la activación en respuesta a la disminución del volumen celular; en contraste, la sobreexpresión de SPAK nativa (*wild-type*) incrementa la actividad de NKCC1 (Dowd & Forbush, 2003). Análogamente, la co-expresión de NKCC1 con SPAK catalíticamente inactiva en oocitos de *Xenopus Leavis* inhibe la activación del cotransportador inducida por encogimiento celular (Gagnon *et al.*, 2005).

Recientes estudios sugieren que SPAK y WNK4 pueden funcionar conjuntamente para regular NKCC1 y KCC2 (Gagnon *et al.*, 2005). Vitari y colaboradores, demostraron que tanto WNK4 así como WNK1 interaccionan, fosforilan y activan a SPAK. La activación de SPAK por cada isoforma de WNK es requerida para la fosforilación *in vitro* del extremo amino terminal de NKCC1 (Vitari *et al.*, 2005).

Se ha reportado que la proteína quinasa SPAK interacciona con varios componentes del citoesqueleto, como la gelsolina y F-actina (Tsutsumi *et al.*, 2000), por lo cual podría potencialmente jugar un papel como proteína de andamiaje o adaptadora (*scaffolding*) (Piechotta *et al.*, 2003). Las proteínas adaptadoras pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien factores o enzimas directamente transductores/as que tras unirse a otra proteína son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo. Por lo tanto, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras, siendo así capaces éstas de transmitir sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales (Nelson & Cox, 2005).

2.3. Propósito de este estudio

Los resultados funcionales obtenidos en nuestro laboratorio sugieren un rol del segmento amino terminal en la cinética de cierre del canal, pudiendo estar relacionado con la interacción de esta quinasa. Tal efecto podría estar relacionado con la interacción a través de SPAK con el citoesqueleto y/o fosforilación. También podría ser posible que tal interacción no exista y el efecto sea secundario a un cambio conformacional provocado por las mutantes.

Teniendo como base los antecedentes presentados, en este trabajo de Tesis se analizará la distribución celular de la proteína quinasa SPAK y su distribución en relación al canal de cloruro CLC-2 y sus variantes. Asimismo, junto con analizar la localización de las proteínas, se estudiará la interacción entre SPAK y CLC-2 tanto *in vivo* como *in vitro*, utilizando para ello las técnicas de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET) y de Co-inmunoprecipitación.

2.3.1. Hipótesis

La Hipótesis de trabajo de la presente Tesis fue la siguiente:

“El mecanismo de cierre del canal CLC-2 es modulado por la interacción directa de su región amino terminal con la proteína quinasa SPAK”.

2.3.2. Objetivo General

Los Objetivos Generales de este trabajo fueron:

- I. Analizar la localización subcelular de rSPAK y su colocalización con gpClC-2.
- II. Analizar la interacción proteína-proteína entre rSPAK y gpClC-2.

2.3.3. Objetivos Específicos.

- I. Construcción de los plasmidios de expresión recombinantes para generar proteínas quiméricas fluorescentes (EGFP, EYFP y ECFP) y proteínas que incorporen los epitopos HA y V5.
- II. Estudiar la localización celular de SPAK de rata en la línea celular HEK-293 y su colocalización con CR1, CR5 y CR1-F84H.
- III. Estudiar la interacción entre SPAK de rata y CR1, CR5 y CR1-F84H *in vitro* mediante experimento de co-inmunoprecipitación.
- IV. Estudiar la interacción entre SPAK de rata y CR1, CR5 y CR1-F84H *in vivo* mediante experimentos de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1 Reactivos

Bio Labs: T4 DNA ligasa, Enzima Acc I.

Bio-Rad: Membrana de nitrocelulosa, Glicina, TEMED.

Clontech: Plasmidio pECFP-N1, Plasmidio pYFP-C1

Dako: Medio de montaje “Fluorescent mountaing medium”

Fermentas: Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder, T4 DNA ligasa, Pfu DNA polimerasa, Enzima Bgl II, Enzima Xba I, Enzima Cla I, Enzima Bpu1102 I, Enzima Bam HI, Enzima EcoR I, Enzima Hind III, Enzima Sac II, Fosfatasa alcalina de camarón (SAP), Long PCR enzyme mix, IPTG.

Invitrogen: Anticuerpo Anti-V5 de ratón, dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), Taq DNA polimerasa, LipofectaminaTM Reagent, Enzima Hind III, Agar, Glicerol.

Gibco BRL, Inc: IPTG, Penicilina-estreptomicina, Suero fetal bovino, X-gal, OPTI-MEM.

Jackson: Anticuerpo IgG anti-rata de burro marcado con peroxidasa de rábano (HRP), Anticuerpo IgG anti-rata de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP), Anticuerpo IgG anti-conejo de burro marcado con peroxidasa de rábano (HRP), Anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

Jamarca: Revelador de película D-72, fijador de película U-3.

J.T. Baker: EDTA

Kodak: Película Kodak BioMax Light-1 film

Lafken: Agarosa.

Merck: CaCl_2 , Etanol 100%, Isopropanol, KCl, KH_2PO_4 , MgCl_2 , NaCl, Na_2HPO_4 , Peptona, Trizma base, Sucrosa.

Molecular Probes: Anti-GFP de conejo, anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a fluoróforo Alexa 488, anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a fluoróforo Alexa 488, anticuerpo de cabra contra IgG de rata conjugado a fluoróforo Alexa 488, anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a fluoróforo Alexa 568, anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a fluoróforo Alexa 568, anticuerpo de cabra contra IgG de rata conjugado a fluoróforo Alexa 568.

Omega BIO-tek, Inc: “E.Z.N.A. Gel Extaction Kit”, anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a fluoróforo Alexa 488

Pierce: “kit SuperSignal[®] West Femto Chemiluminescent Substrate”, “Micro BCA[™] Protein Assay Reagent Kit”

Promega: T4 DNA ligasa, pGEM-T Vector Systems, pGEM-T Easy Vector Systems, “Wizard Plus Midipreps DNA Purification System”, “Wizard Plus Mixipreps DNA Purification System”.

QIAGEN: “kit QIAEX II Agarose Gel Extraction”, “kit QIAprep Spin Miniprep”, “kit QIAGEN Plasmid Midi”.

Roche: Anticuerpo Anti-HA de rata (clon 3F10)

Santa Cruz Biotechnology, Inc: Proteína G PLUS-Agarosa.

Sigma Chemical Co: Ácido acético, ampicilina, azul de bromofenol, romuro de etidbio, HEPES, kanamicina, paraformaldehído, tritón X-100, DMEM (Dulbecco’s minimal essential medium), acetato de sodio, SDS, DMSO, PMSF, leupeptina, aprotinina, ortovanadato sódico, EGTA, sulfato de sodio, persulfato de amonio, colorante Ponceau S solution, tween-20, DTT, igepal, poli-L-lisina.

UB (Ursula Biggemann y Cia. Ltda.): RNasa

Winkler: Marcador preteñido de proteínas, gelatina, acrilamida: bis-acrilamida.

3.1.2. Equipos

Termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400, microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet), Centrífuga CS-15R (Beckman), espectrofotómetro Spectronic[®] Genesys[™] 2, fuente de poder model P 4001 (Life Technologies), fuente de poder “PowerPac Basic[™] Power Supply (Bio-Rad), Speed Vac[®] Plus modelo SC110A (Savant), cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa Horizon[®] 58 (Life Technologies), cámara de electroforesis vertical para geles de poliacrilamida Mini-PROTEAN[®] 3Cell (Bio-Rad), cámara de electrotransferencia (Hoefer Pharmacia Biotech, Inc.), cámara de transferencia electroforética semi-seca Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad), electroporador Gene Pulser X cell[™] Electroporation System (Bio-Rad), microscopio Zeiss LSM 5 Pascal, microscopio Olympus IX70, microscopio Nikon Eclipse E600, transiluminador UV Vilber-Lourmant, estufa de cultivo con inyección de CO₂ (Thermoforma).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA SPAK ETIQUETADA CON EL EPÍTOPO HA.

3.2.1.1. Diseño de partidores

Los partidores específicos para la proteína quinasa SPAK fueron diseñados a partir de la secuencia nucleotídica rSPAK (rat SPAK GenBank: AF099990 nt 42-1924). Este plasmidio fue una donación del Dr. Gaetano Naselli del Instituto de Investigación Medica Walter y Eliza Hall, Hospital Royal Melbourne, Australia. El partidor en dirección sentido mSPAKsen2 (5`AAG AAG GTA AGG CGA GTT CC 3`) se ubicó río arriba del sitio de restricción *BstP I* y el partidor antisentido SPAKHAXbarev2 (5` CAG CAA GGA ATC TAG ATC AAG CGT AGT CTG GGA CGT CGT ATG GGT AGC TCA CAC TC 3`) incorporó el epítipo de hemaglutinina HA (5` YPYDVPVYA 3`) y un sitio de restricción *Xba I*, después del codón de término; el cual permitirá clonar el producto de PCR en el vector de expresión. Estos partidores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. USA.

3.2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un Termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400, usando una mezcla de reacción estándar que contenía: templado de DNA de

pCR3.1-SPAK (14 ng/μl), 0,2 μM de cada partidor, 100 mM de dNTPs y una mezcla de las enzimas Pfu y Taq DNA Polimerasa (proporción 1:3), en un volumen final de reacción de 50 μl.

Las condiciones de PCR se iniciaron con una denaturación a 94°C por 2 minutos seguidos de 5 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 15 segundos, una fase de alineamiento a 58°C por 30 segundos y una fase de elongación a 72°C por 1 segundo. A continuación se realizan 15 ciclos a 94°C por 15 segundos, una fase de alineamiento a 54°C por 30 segundos y una fase de elongación a 72°C por 1 segundo. Adicionalmente se realiza una extensión final de 1 minuto a 72°C.

3.2.1.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron realizando una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 1,0 % en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Las muestras se mezclaron con un tampón de corrida 1X (0,25 % azul de bromofenol, 30 % glicerol) y se cargaron en los pocillos. Se utilizó un marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas). El voltaje se fijó en 70 V, por 45-60 minutos en una fuente de poder Model 4001 P (Life Technologies). Las bandas de DNA se visualizaron por medio de la tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) en un transiluminador con una lámpara UV donde fueron fotografiadas para luego ser procesadas. Los fragmentos de DNA de 595 pb se extrajeron cortando el trozo de gel, los cuales se purificaron utilizando el kit QIAEX II Agarose Gel Extracción (QIAGEN). La agarosa se derritió a 50°C por 10 minutos, en un tampón a pH 7,5 (Tampón QX1). Luego se agregó una solución que contenía una resina en suspensión (QIAEX

II), a la cual se une el DNA a pH ácido. El DNA unido a la resina se lavó 2 veces con un tampón que contenía etanol 100% (Tampón PE). La resina se secó por 30 segundos, y el DNA se eluyó con 20 µl de agua nano pura estéril. Los pasos de precipitación y resuspensión de la resina se realizaron en una microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet)

3.2.1.4. Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T EASY

El producto de PCR se insertó en el vector de clonamiento pGEM-T Easy (Promega). Este vector presenta en los extremos 3' terminal del sector colindante a la región de inserción del producto a clonar, el nucleótido timidina, mejorando así la eficiencia de la reacción de ligación. Además posee un gen que confiere resistencia a antibiótico (ampicilina). También posee el gen de la β-galactosidasa que permite la selección de las colonias que han sido transformadas con el vector religado, las que presentan una coloración azul, cuando las colonias presentan el vector ligado con el inserto deseado, se interrumpe la secuencia del gen de esta enzima y por tal motivo son incapaces de metabolizar X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil-beta-D-galactosido) exhibiendo una coloración blanca.

La reacción de ligación fue llevada a cabo usando la enzima T4-DNA ligasa 20 U/µl (Promega), con 5 µl de tampón 2X Rapid (60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 20 mM MgCL₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP y 10 % polietilenglicol) durante 2 horas a temperatura ambiente en un volumen final de 10 µl. La relación molar entre inserto y vector fue de 3:1, siendo la concentración del vector de 50 ng/µl.

3.2.1.5. Transformación de células competentes

El plasmidio resultante de la reacción de ligación fue transformado en células competentes Dam⁻ (metilasa negativa) de *E. coli.*, para lo cual se empleó el método de shock térmico. Se utilizaron alícuotas de 50 µl de células competentes a las cuales se les agregó 5 µl de reacción de ligación y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego se aplicó un shock térmico por 1 minuto a 37°C y se incubó por 2 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 450 µl de medio de cultivo LB sin antibiótico y se mantuvo por 1 hora a 37°C con una agitación de 225 rpm. Posteriormente las células se cultivaron en placas de agar que contenían 100 µg/ml ampicilina, 80 µg/ml X-gal y 0,5 mM de IPTG y se dejaron incubando toda la noche a 37°C. Sólo las colonias bacterianas que presentaron una coloración blanca, se cultivaron en 5 ml de medio líquido LB, en presencia de 100 µg/ml ampicilina y con agitación constante de 225 rpm a 37°C toda la noche.

3.2.1.6. Purificación de DNA plasmidial por el método de pequeña escala

La extracción de DNA plasmidial se realizó colectando 1,5 ml del cultivo bacteriano líquido y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos en microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet). Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 140 µl de solución STET (10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0), 5% (v/v) Tritón X-100). Se realizó un shock térmico a la muestra, dejando por 1 minuto en agua hervida y luego en hielo por 2 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante en un tubo

nuevo. A esta fase acuosa se le agregó 150 µl de isopropanol frío (-20°C) y se dejó precipitando durante 5-10 minutos a -20°C. A continuación se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 300 µl de etanol 70% frío (4°C), luego se centrifugó por 5 minutos y el sobrenadante se aspiró con bomba de vacío. El sedimento se secó al aire y se disolvió con 30 µl de agua nano pura estéril. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito en Molecular Cloning a Laboratory Manual (3^a Ed. 2001)

3.2.1.7. Doble digestión con enzimas de restricción

La existencia del producto de amplificación en el plasmidio extraído desde las bacterias transformadas con la reacción de ligación, se verificó realizando un análisis de restricción con enzimas que cortan en posiciones específicas en la secuencia de DNA de interés. Las enzimas utilizadas para tal efecto fueron *Bgl II* y *Xba I*. Para la reacción de digestión se tomaron: 10 µl del DNA extraído, 2 µl de tampón de digestión de ambas enzimas 10X, 2 µl de RNasa (4 mg/ml), 0,5 µl de *Bgl II* (10 U/µl), 0,5 µl de *Xba I* (10 U/µl). El volumen final se ajustó con agua nano pura estéril. La mezcla se dejó incubar por 2 horas a 37°C.

La verificación del análisis de esta digestión se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % usando como tampón de corrida TAE 1X. Las bandas de DNA se visualizaron por medio de la tinción con bromuro de etidio en un transiluminador con una lámpara U.V. y fotografiadas para luego ser procesadas.

3.2.1.8. Purificación de DNA plasmidial por el método de minipreparación

Confirmada la presencia del producto de amplificación, se tomaron 3 ml de una de estas colonias que se seleccionó y se purificó su DNA utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Las células bacterianas se sedimentaron y resuspendieron en tampón con RNasa (P1), luego se adicionó un tampón de lisis que contenía 200 mM NaOH y 1,0 % SDS (P2) y se neutralizó la reacción adicionando tampón N3. Se centrifugó para obtener un sobrenadante claro, el cual contenía DNA y se traspasó a una columna. El paso por la columna se realizó por centrifugación utilizando una microcentrifuga Spectrafuge 16M (Labnet). La columna se lavó con una solución salina (PE) y se eluyó el DNA con 50 µl de agua nano pura estéril.

La cuantificación del DNA se realizó por comparación de las intensidades de las bandas generadas por la doble digestión enzimática de *Bgl II* y *Xba I*, con respecto al marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.1.9. Subclonamiento del fragmento de SPAK en el plasmidio pCR3.1-rSPAK

El fragmento de DNA de SPAK con el epítipo de HA, generado por PCR, se extrajo desde el vector pGEM-T Easy y se incorporó al vector de expresión de células de mamíferos pCR3.1-rSPAK, el cual se había elaborado previamente en nuestro Laboratorio. La digestión del primero se realizó con las enzimas *Bgl II* y *Xba I*, recuperándose una banda de 490 pb que correspondía al inserto. El fragmento de DNA fue extraído desde un gel de agarosa al 1,0 % y se purificó el DNA utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN). Una vez extraído, el

DNA fue ligado en el vector pCR3.1-rSPAK previamente digerido con *Bgl II* y *Xba I* y desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón (1 U/ μ l) con lo que se restableció la secuencia de rSPAK con el epítipo de HA incorporado. La fosfatasa alcalina de camarón cataliza la liberación de grupos 5' y 3' fosfato desde DNA, RNA y nucleótidos.

La reacción de ligación se realizó usando la enzima T4-DNA ligasa 1 U/ μ l (Fermentas). Como control de la religación del vector, se realizó una reacción en que la única diferencia con respecto a la reacción de ligación experimental fue la falta de inserto, en este caso el fragmento de DNA de 490 pb. El DNA plasmidial obtenido de la ligación fue transformado en células competentes Dam-. Las colonias de bacterias crecidas en la placa experimental (reacción de ligación más inserto) se dejaron creciendo toda la noche en 5 ml de medio LB con 5 μ g/ml de ampicilina, para la posterior extracción del DNA plasmidial. La verificación de la presencia del DNA de interés fue analizada por medio de un ensayo de restricción con la enzima *EcoR I* y *Xba I*, sitios de restricción que flanquean la secuencia completa de la proteína SPAK. Confirmada la presencia de vector y de la proteína, se tomaron 3 ml de la colonia que se seleccionó y se purificó el DNA utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Finalmente se confirmó la secuencia modificada de la proteína SPAK, incluyendo los sitios de restricción en los cuales se realizó el clonamiento (Retrogen Inc).

3.2.1.10. Purificación de DNA plasmidial por el método de midipreparación

A partir de un cultivo bacteriano de 50 ml en medio LB-ampicilina de 16 horas se realizó la purificación del DNA con el kit QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN). Este kit se basa en la lisis

celular alcalina y la purificación de DNA plasmidial por medio de una columna que contiene una resina de intercambio iónico. Las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en un tampón que contenía RNasa (P1), luego se agregó un tampón de lisis de 200 mM NaOH y 1,0 % SDS (P2), se mezcló por inversión, y la reacción se detuvo con un tampón de neutralización (P3). Se centrifugó para obtener un sobrenadante claro que contenía el DNA, el cual se filtró y se cargó en la columna. El paso por la columna se realizó por medio de la aplicación de presión generada por una bomba de vacío. La columna se lavó con una solución salina (QC) y se eluyó el DNA con un tampón que contenía isopropanol (QF). Se reprecipitó el DNA utilizando isopropanol a temperatura ambiente y se lavó con 70 % etanol, para luego dejarlo secando al aire. El DNA se resuspendió en 100 µl de agua nano pura estéril y se guardó a -20 °C. Los pasos de centrifugación se realizaron en una centrifuga CS-15R (Beckman).

3.2.1.11. Cuantificación de DNA plasmidial

La cuantificación del DNA extraído se hizo por medio de un espectrofotómetro Spectronic® GenesysTM 2. La muestra de DNA plasmidial purificado se diluyó 100 veces, y se le midió la absorbancia contra un blanco de agua destilada a una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó la relación $1\text{DO}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ para calcular la concentración de la muestra, a través de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{DO}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilución} \times 1\text{ml}/1000\mu\text{l}$$

3.2.2. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNAS RECOMBINANTES CR5-GFP Y CR1-F84H-GFP.

3.2.2.1. Subclonamiento de la región variable de CR1 en el plasmidio pEGFP-N1-CR1

Se subclonó un fragmento de la secuencia de gpClC-2 que codifica una variante de empalme, CR5 y un fragmento de secuencia de gpClC-2 que incluye una mutación puntual, F84H, desde el plasmidio pCR3.1 al vector pEGFP-N1-CR1, el cual se había elaborado previamente en nuestro laboratorio. Las digestiones se realizaron utilizando 3 µg tanto de CR5 como de CR1-F84H, 0,5 µl de *Hind III* (10 U/µl) y 0,5 µl de *Acc I* (10 U/µl), 2 µl del tampón específico de la enzima *Hind III* y agua nano pura estéril para completar un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1,0 % en TAE 1X. Se purificó el fragmento de DNA correspondiente a 1179 pb (CR5) y 1221 pb (CR1-F84H) utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN). Posteriormente el DNA fue ligado en el vector pEGFP-N1-CR1 previamente digerido con *Hind III* y *Acc I* y desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón (1 U/µl) con lo que se restableció la secuencia de gpClC-2.

La reacción de ligación se efectuó utilizando una razón molar vector / inserto de 1:3, T4-DNA ligasa 20 U/µl (Promega) y 5µl de tampón de ligasa a un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se transformaron células competentes DH5α de E.coli. por el método de shock térmico. El protocolo continuó como se describe en el capítulo 3.2.1.10.

3.2.3. GENERACIÓN DE PROTEÍNAS CR1, CR5 Y CR1-F84H ETIQUETADAS AL EPÍTOPO V5

3.2.3.1. Diseño de partidores

Los partidores específicos para la proteína ClC-2 fueron diseñados a partir de la secuencia nucleotídica gpClC-2 (guinea pig ClC-2 GenBank: AF113529). El partidor en dirección sentido CRFOR4 (5`CTC TAC GAC AGC ATC ATC C 3`) se ubicó río arriba del sitio de restricción *Esp3 I* y el partidor antisentido CRstopXbaIrev (5` GTC TAG AGC GGT TAA CTG GCA CTT GTC 3`) incorporó un sitio de restricción *Xba I*, eliminando el codón de término; el cual permitirá clonar del producto de PCR en el vector de expresión. Estos partidores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.

3.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termo ciclador PerkinElmer GeneAmp 2400, usando una mezcla de reacción estándar que contenía: templado de DNA de pCR3.1-CR1 (10 ng/μl), 0,2 μM de cada partidor, 100 mM de dNTPs y una mezcla de las enzimas Pfu y Taq DNA Polimerasa (proporción 1:3), en un volumen final de reacción de 50 μl. Las condiciones de PCR se iniciaron con una denaturación a 94°C por 2 minutos seguidos de 15 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 15 segundos, una fase de alineamiento a

60°C por 30 segundos y una fase de elongación a 72°C por 1 segundo. Adicionalmente se realiza una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis, para luego ser extraídos y purificados.

3.2.3.3. Subclonamiento del producto de PCR y la secuencia codificante de CR1 en el plasmidio pcDNA3.1-V5

Se subclonó un fragmento del producto de PCR y un fragmento de la secuencia de gpCLC-2 (CR1), desde el plasmidio pEGFP-N1, para reconstituir la secuencia de la proteína en el vector pcDNA3.1-V5. Este plasmidio posee el epitopo V5 (5`GKPIPNPLLGLDST 3`), el cual permitirá realizar los estudios de interacción proteína-proteína *in vitro*. Las digestiones se realizaron utilizando 0,5 µl de *Hind III* (10 U/µl) y 0,5 µl de *Cla I* (10 U/µl), adicionando 2 µl del tampón específico de la enzima *Cla I*, para el plasmidio pEGFP-CR1 y para la digestión del producto de PCR se utilizaron 0,5 µl de *ClaI* y 0,5 µl de *Xba I* (10 U/µl), adicionando 2 µl del tampón específico para ambas enzimas. Para las reacciones de digestión se utilizó agua nano pura estéril para completar un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1,0 % en TAE 1X. Se purificaron los fragmentos de DNA correspondiente a 2562 pb (CR1) y 338 pb (producto de PCR), los cuales una vez extraídos fueron ligados al vector pcDNA3.1-V5 previamente digerido con *Hind III* y *Xba I* y desfosforilado con lo cual se restableció la secuencia de CR1.

La reacción de ligación se efectuó utilizando una razón molar vector/inserto/inserto de 1:3:3, T4-DNA ligasa 400 U/μl (BioLabs) y 1μl de tampón de ligasa a un volumen final de 10 μl. La mezcla se incubó a 22°C durante 30 minutos. Posteriormente se transformaron células competentes DH5α de *E. coli* por el método de shock térmico. El protocolo continuó como se describe en el capítulo 3.2.1.10.

3.2.3.4. Subclonamiento de la región variable de CR1 en el plasmidio pcDNA3.1-V5-CR1

Se subclonó la región variable de gpClC-2 (CR1), correspondiente a CR5 y CR1-F84H, desde el plasmidio pEGFP-N1 al vector de expresión de células de mamífero pcDNA3.1-V5-CR1. Las digestiones se realizaron utilizando 1 μg tanto de CR5 como de CR1-F84H, 0,5 μl de *Hind III* y 0,5 μl de *Bpu1102 I* (10 U/μl), 2 μl del tampón específico de la enzima *Bpu1102 I* y agua nano pura estéril para completar un volumen final de 20 μl. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1,0 % en TAE 1X y se purificó el fragmento de DNA correspondiente aproximadamente 500 pb (CR5 y CR1-F84H). Posteriormente el DNA fue ligado en el vector pcDNA3.1-V5-CR1 previamente digerido con *Hind III* y *Bpu1102 I* y desfosforilado con lo que se restableció la secuencia de gpClC-2.

La reacción de ligación se efectuó utilizando una razón molar vector / inserto de 1:3, T4-DNA ligasa 400 U/μl (BioLabs) y 1μl de tampón de ligasa a un volumen final de 10 μl. La mezcla se incubó a 22°C durante 30 minutos. A continuación se transformaron células competentes DH5α de *E. coli* por el método de shock térmico. El protocolo continuó como se describe en el capítulo 3.2.1.10.

3.2.4. GENERACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP.

3.2.4.1. Subclonamiento de la secuencia de gpClC-2 en el plasmidio pECFP-N1

Se subclonó la secuencia codificante de CR1, CR5 y F84H, desde el plasmidio pEGFP-N1 al vector de expresión de células de mamífero pECFP-N1. Las digestiones se realizaron utilizando 0,5 µl de *Hind III* y 0,5 µl de *Bpu1102 I*, adicionando 2 µl del tampón específico de la enzima *Bpu1102 I*, para el plasmidio pCR3.1-CR1, pCR3.1-CR5 y pCR3.1-CR1-F84H y para la digestión de pEGFP-N1-CR1, la región invariable de la secuencia de la proteína gpClC-2, se utilizaron 0,5 µl de *Bpu1102 I* y 0,5 µl de *BamH I* (10 U/µl), adicionando 2 µl del tampón específico para ambas enzimas. Para todas las reacciones de digestión se utilizó agua nano pura estéril para completar un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, observándose el DNA digerido en un gel de agarosa al 1,0 % en TAE 1X. Se purificaron los fragmentos de DNA correspondiente a 2500 pb (CR1) y de aproximadamente 500 pb (CR1, CR5 y CR1-F84H). Posteriormente el DNA fue ligado en el vector pECFP-N1 previamente digerido con *Hind III* y *Bam HI* desfosforilado, restableciendo la secuencia de gpClC-2.

La reacción de ligación se efectuó utilizando una razón molar vector/inserto/inserto de 1:4:4, T4-DNA ligasa 400 U/µl (BioLabs) y 1µl de tampón de ligasa a un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a 22°C durante 30 minutos. Se transformaron células competentes DH5α de *E. coli* por el método de shock térmico y continuó el procedimiento como se describe en el capítulo 3.2.1.10.

3.2.5. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EYFP-SPAK.

3.2.5.1. Diseño de partidores

Los partidores específicos para la proteína quinasa SPAK fueron diseñados a partir de la secuencia nucleotídica rSPAK (rat SPAK GenBank: AF099990 nt 42-1924). El partidor en dirección sentido EcoMETSpaksense (5`CGG AAT TCC ATG GCG GAG CCG AGC GGC TCG 3`) incorporó un sitio de restricción *Eco RI*, río arriba del codón de inicio y el partidor antisentido mPASKrev2 (5' CAT AGC CTC TCA CCT GTT CC3') ubicado río abajo del sitio de restricción *EcoR V*; los cuales permitirán clonar del producto de PCR en el vector de expresión. Estos partidores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.

3.2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador PerkinElmer GeneAmp 2400, usando una mezcla de reacción estándar que contenía: templado de DNA de SPAKpCR3.1 (1 ng/μl), 0,2 μM de cada partidor, 100 mM de dNTPs, 0,3 μl de Long PCR enzyme mix y DMSO al 4,0 %, en un volumen final de reacción de 50 μl. Las condiciones de la PCR se iniciaron con una denaturación a 94°C por 2 minutos seguidos de 10 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 45 segundos, una fase de alineamiento de 10 ciclos a temperaturas decrecientes de 68°C a 58°C, disminuyendo la temperatura cada 1 ciclo (*Touchdown*) y una fase de elongación a 72°C por 1 segundo. A continuación se realizan 15

ciclos a 94 °C por 45 segundos, una fase de alineamiento a 54°C por 30 segundos y una fase de elongación a 72°C por 1 segundo. Adicionalmente se realiza una extensión final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis, para posteriormente ser extraídos y purificados.

3.2.5.3. Subclonamiento del producto de amplificación en el vector pGEM-T

El producto de PCR se insertó en el vector de clonamiento pGEM-T (Promega). Este vector se diferencia del vector de clonamiento pGEM-T easy, descrito anteriormente, solo por las enzimas de restricción del sitio de multiple clonamiento.

La reacción de ligación fue llevada a cabo usando la enzima T4-DNA ligasa 5 U/μl (Fermentas), con 2 μl de tampón 5X Rapid (335 mM Tris-HCl (pH 8,8), 33 mM MgCL₂, 5 mM DTT, 84 mM (NH₄)₂SO₄) durante 1 hora a temperatura ambiente en un volumen final de 10 μl. La relación molar de vector / inserto fue de 1:3, siendo la concentración del vector de 50 ng/μl.

El plasmidio resultante de la reacción de ligación fue transformado en células competentes DH5α de *E. coli* y se procedió análogamente al protocolo de las bacterias Dam-.

3.2.5.4. Subclonamiento del fragmento de SPAK en el plasmidio pEYFP-C1-rSPAK

El fragmento de DNA de SPAK que se extrajo desde el vector pGEM-T, se incorporó al vector de expresión de células de mamífero pEYFP-C1-rSPAK, el cual se había elaborado

previamente en nuestro laboratorio, pero tenía el marco de lectura corrido en los primeros 30 aminoácidos. La digestión del primero se realizó con las enzimas *EcoR I* (10 U/μl) y *EcoR V* (10 U/μl), recuperándose una banda de 477 pb que correspondía al inserto. Una vez extraído el DNA del gel fue ligado en el vector pEYFP-C1-rSPAK previamente digerido con *EcoR I* y *EcoR V*, y desfosforilado para reestablecer la secuencia de rSPAK.

La reacción de ligación se realizó usando la enzima T4-DNA ligasa 5 U/μl (Fermentas), a una razón molar vector / inserto de 1:3. La mezcla se incubó a 22°C durante 30 minutos. A continuación se transformaron células competentes DH5α de *E. coli* por el método de shock térmico. El procedimiento continuó como se describe en el capítulo 3.2.1.10. Finalmente se confirmó la secuencia de la proteína SPAK, incluyendo los sitios de restricción en los cuales se realizó el clonamiento (Retrogen Inc).

3.2.6. CULTIVO CELULAR

Las células embrionarias de riñón humano (HEK-293) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) baja glucosa con F-12 HAM, suplementado con 7,0 % suero fetal bovino (SFB) y 1,0 % penicilina-estreptomicina. Las células fueron cultivadas en placas de 100 mm y se subcultivaron cuando alcanzaban un 60-80 % de confluencia. Para despegar las células se utilizó una solución de tripsina 1X en PBS 1X (1,37 mM NaCl, 2,70 mM KCl, 1,52 mM Na₂HPO₄, 1,50 mM KH₂PO₄). Las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda y 5,0 % de CO₂.

3.2.7. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Las células HEK-293 se subcultivaron a partir de una placa de 100 mm con 80 % de confluencia a 2 placas de 100 mm y se incubaron por 24 horas, con el fin de obtener células que se encuentren en la fase de crecimiento exponencial. A partir de una de las placas de 100 mm se realiza una transfección aguda por el método de electroporación. A la placa se le elimina el medio de cultivo y se lava 2 veces con 3 ml de PBS 1X para eliminar restos celulares. Las células son despegadas con 1 ml de tripsina 1X (tripsina 0.25 %, EDTA 1 mM en PBS pH 7,8) y la reacción es detenida adicionando 3 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con suero fetal bovino. La suspensión celular se transfiere a un tubo de 15 ml estéril y se centrifuga a 2000 rpm por 2 minutos, se elimina el medio y se adicionan 5 ml de medio OPTI-MEM[®] (Hepes, Bicarbonato de sodio, L-glutamina) y se repite la centrifugación. Se elimina el medio y se resuspende el sedimento celular en 200 µl de medio OPTI-MEM[®]. Utilizando dos cubetas de electroporación de 2 mm (BiO-RAD) se adiciona en cada una, 1µg de DNA y 100 µl de suspensión celular. Se realiza la electroporación según el programa preexistente en el electroporador BIO-RAD para células HEK-293 (Pulso cuadrado: voltaje 110 (V), longitud del pulso 25 (msec)). Finalmente se adiciona 1 ml de medio de cultivo a la cubeta y se distribuye en 2 placas de 35 mm, que contenían previamente 1,5 ml de medio de cultivo con 3 cubre objetos de 12 mm cada uno o 1 cubre objeto de 25 mm, para análisis microscópicos. Las células se analizaron 24 horas después de realizada la transfección.

3.2.8. FIJADO DE CÉLULAS

El medio de cultivo se descartó de las células y se lavaron 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Se fijaron con 4,0 % paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se eliminó la autofluorescencia con glicina 1 mM por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó una vez con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se montaron los cubreobjetos en porta objetos utilizando medio de montaje DAKO (Dakocytomation fluorescent mounting medium). Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas y a expensas de la luz. Las muestras son almacenadas a 4°C.

3.2.9. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células crecidas en cubre objetos se lavan por 5 minutos con PBS 1X 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 y se fijaron por 30 minutos con 4,0 % paraformaldehído en PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. A continuación se lavaron 3 veces por 5 minutos con 10 mM glicina-PBS para eliminar la autofluorescencia. Las células se permeabilizaron durante 15 minutos con 0,1 % tritón X-100 en PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y luego se bloqueó por 30 minutos con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 0,2 % gelatina. Las células se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y sin agitación con el anticuerpo primario, anti-HA de rata (clon 3F10) o anti-V5 de ratón, diluidos en 1/200 y 1/500 en solución de bloqueo, respectivamente. Terminada la incubación se realizan 4 lavados de 5 minutos cada uno con 0,1 % tritón X-100 en PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y un lavado con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 0,2 % gelatina por 10 minutos. Se incubó el anticuerpo secundario, Alexa Fluor 568 en dilución 1/500 con

solución de bloqueo, por 30 minutos a temperatura ambiente, sin agitación y exposición a la luz. A continuación se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno con 0,1 % tritón X-100 en PBS- $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ y un lavado con PBS- $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ por 5 minutos. Los cubre objetos se montaron en porta objetos con medio de montaje DAKO. Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente y en agitación suave, excepto la incubación con ambos anticuerpos. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario, reemplazando el volumen de éste por solución de bloqueo.

3.2.10. MICROSCOPIA CONFOCAL

Todas las preparaciones se analizaron por microscopía confocal con un microscopio Zeiss LSM 5 Pascal. Las muestras se excitaron con un láser de 488 nm y la emisión se colectó entre 505 y 550 nm, para detectar la señal de la proteína fluorescente verde y del anticuerpo Alexa flúor 488. Para detectar la señal del anticuerpo Alexa Flúor 568 las muestras se excitaron con un láser de 543 nm y la emisión se colectó entre 560 y 615 nm. Se utilizó el objetivo C-Apochromat 63x/1.2 water, de inmersión en agua. El porcentaje de intensidad del láser y la apertura del pinhole se ajustaron dependiendo de la intensidad de la señal de fluorescencia. Las imágenes en campo claro se obtuvieron utilizando luz visible.

3.2.11. TRANSFECCION TRANSITORIA PARA ESTUDIO DE PROTEÍNAS

A partir de una placa de 100 mm con 80% confluencia de células HEK-293 se realizaron transfecciones y co-transfecciones agudas por método de electroporación. Luego de tripsinizar las células, se sedimentaron y se lavaron con 5 ml de medio OPTI-MEM[®]. El sedimento celular se resuspendió en 200 µl de medio OPTI-MEM[®] y se distribuyeron en partes iguales en dos cubetas de 2 mm, adicionando 2 µg de pCR3.1-SPAKHA y/o 4 µg de pEGFP-CR1, pEGFP-CR5, pEGFP-CR1-F84H, pcDNA3.1-V5-CR1, pcDNA3.1-V5-CR5 o pcDNA3.1-V5-CR1-F84H. La electroporación se realizó según el programa preexistente en el electroporador BIO-RAD para células HEK-293. A continuación cada cubeta con la suspensión celular electroporada se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo y fueron transferidas a un tubo de 15 ml estéril, para su completa resuspensión y depositadas en una placa de 100 mm, que contenía previamente 10 ml de medio de cultivo. Las células se dejaron incubando durante 24 horas, luego de lo cual se obtuvo un 80 % de confluencia.

3.2.11.1. Preparación de extractos totales

A las células se les retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, para eliminar restos de suero y medio. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1,0 % igeal, 1 mM EGTA) suplementado con inhibidores de proteasas; leupetina 1 µg/µl, aprotinina 1µg/µl, PMSF 1mM, 10 mM NaF y ortovanadato sódico 1 mM y mediante una espátula plástica se realizó un “scrapping” o rascado. Las células se

homogeneizaron por 30 minutos a 4°C en rotación y se centrifugaron a 4500 x g por 5 minutos a 4°C en centrífuga CS-15 R centrifuge (Beckman). Tras la centrifugación se descartó el sedimento celular y el sobrenadante se cuantifica por el método del ácido bicincónico (1985), basado en la reducción de Cu(II) a Cu(I) en medio alcalino y la formación de un complejo ácido bicincónico: Cu(I), con un máximo de absorbancia a 562 nm. El análisis cuantitativo de proteínas se realizó utilizando el sistema Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante, para lo cual se utilizó el espectrofotómetro Spectronic® GenesysTM2. La muestra se preparó en un tampón de carga 2X (tris-HCl 240 mM (pH 8.8), 20 % glicerol, 5,6 % SDS, 0.2 % azul de bromo fenol, 100 mM DTT). La muestra así tratada se incubó por 10 minutos a 65°C.

3.2.11.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970) de tampón discontinuo con algunas modificaciones. Se prepararon los geles de acuerdo a las siguientes proporciones: Gel separador al 10 % a un volumen de 10 ml (2,5 ml de tampón separador (tris-HCl 1,5 M pH 8,8), 2,7 ml de acrilamida 30 % (acrilamida 29,2 % y bisacrilamida 0,8 %), 4,6 ml de agua destilada, 100 µl de SDS, 100 µl de persulfato de amonio al 10 % y 4 µl de TEMED). Gel apilador al 5,0 % a un volumen de 3 ml (0,38 ml de tampón apilador (tris-HCl 0,5 M pH 6,8), 0,5 ml de acrilamida 30 % (acrilamida 29,2 % y bisacrilamida 0,8 %), 2,1 ml de agua destilada, 30 µl de SDS, 30 µl de persulfato de amonio al 10 % y 3 µl de TEMED). Los geles se prepararon en placas de vidrio con espaciadores de 1,5 mm de espesor. Sobre el gel separador ya solidificado se colocó el gel

apilador y para correr el gel se utilizó un tampón de corrida que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 190 mM y SDS 0,1 %. En todas las electroforesis se usó una mezcla de marcadores preteñidos (Winkler) que facilitaron la observación de la corrida. Una vez cargadas la muestra y el marcador, los geles se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa Horizon[®] 58 (Life Technologies) a voltaje constante inicial de 70 V por 20 minutos y luego a 100 V durante 2 horas.

3.2.11.3. Electrotransferencia de proteínas

La transferencia se llevó a cabo según el método de Towbin (1979), con algunas modificaciones. Después de la electroforesis, los geles fueron equilibrados por diez minutos en el tampón de transferencia (tris-HCl 48 mM (pH 8,3), glicina 39 mM, metanol 20 % y SDS 0,037 %). Se utilizaron membranas de nitrocelulosa con un poro de 0,45 μ m de diámetro (BIO-RAD), que fue equilibrada en el mismo tampón. Tanto el gel como la membrana, se empaquetaron por ambos lados en papel filtro y esponjas humedecidas en el tampón y se depositaron en una cámara de electrotransferencia (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.) donde la membrana se orientó hacia el polo positivo o ánodo del circuito. La transferencia se realizó a 130 mA por 12 horas usando el tampón de transferencia.

Alternativamente se utilizó el sistema transferencia semiseco, en el cual los geles fueron sometidos a una intensidad de corriente de 20 mA durante 1 hora, entre dos electrodos planos entre los que se colocó una pila formada por tres papeles filtros, el gel, la membrana de nitrocelulosa y tres papeles filtros, empapados en tampón de transferencia. El papel filtro, gel y

membrana; fueron equilibradas previamente durante 30 minutos en tampón de transferencia (sin ajustar pH).

Transcurrida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se desprendió del gel y se lavó 3 veces con agua destilada en agitación por 2 minutos cada vez. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se tiñó con el colorante Ponceau S solution (0,1 % Ponceau S, 5,0 % ácido acético). La eliminación del colorante se realizó lavando 3 veces por 5 minutos con tampón TBS (Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM) con 0.1 % Tween 20 (TBS-T).

3.2.11.4. Inmunotinción de electrotransferidos e identificación de proteínas

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en las concentraciones que se indican: anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata, anti-GFP policlonal de conejo ambos en dilución 1/4000 y anti-V5 monoclonal de ratón diluido 1/5000. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron anti rata, anti conejo y anti ratón todas en dilución 1/50.000. Las membranas se bloquearon en tampón de bloqueo (TBS, 0,1 % Tween 20, 5,0 % leche descremada en polvo) por 1 hora, a temperatura ambiente y a agitación constante. Una vez bloqueada la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo por 2 horas. Concluida la incubación con este anticuerpo la membrana fue lavada seis veces por 5 minutos en un volumen abundante de TBS-T con agitación constante, posteriormente se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario –anti IgG- conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) diluido en tampón de bloqueo. Concluida la incubación con este anticuerpo la membrana fue lavada cuatro veces

por 5 minutos en un volumen abundante de TBS-T, seguido de dos lavados de 5 minutos en TBS, a temperatura ambiente y con agitación constante. Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas usando el método de quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando películas fotográficas Kodak BioMax Light-1 film.

3.2.12. ESTUDIO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO* MEDIANTE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Previo al proceso de inmunoprecipitación, se dejó incubando 20 µl proteína G PLUS-agarosa con el anticuerpo inmunoprecipitante, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente el complejo formado por la proteína G PLUS-agarosa y el anticuerpo se colectan por centrifugación por 15 segundos a máxima velocidad. El complejo se incuba con los extractos de proteínas totales, que fueron resuspendidos en 500µl de tampón de lisis, descrito anteriormente. El período de incubación es de 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se sedimentó el complejo inmunoprecipitado por centrifugación a máxima velocidad por 15 segundos y se lavó 3 veces con 1 ml de tampón TS (150 mM NaCl, 20 mM tris (pH 7,5), 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂). Cada lavado consistió en mezclar por inversión y luego volver a centrifugar. El inmunoprecipitado se resuspendió en 40 µl de tampón de carga 2X, detallado anteriormente y se incubó por 10 minutos a 65°C. Los complejos proteícos fueron analizados por Western blot.

3.2.13. ESTUDIO DE INTERACIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VIVO* MEDIANTE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FLUORESCENCIA (FRET)

3.2.13.1. Plasmidios utilizados

Como proteína actuando de fluoróforo “Donador” se utilizaron las proteínas CR1, CR5 y CR1-F84H fusionadas a ECFP, y como proteínas actuando de fluoróforo “Receptor” se utilizó la proteína kinasa SPAK fusionada a EYFP.

3.2.13.2. Co-transfecciones

La co-transfección de los plasmidios para FRET y el control negativo además de la transfección del plasmidio para control positivo, se realizó en la línea celular HEK 293 con el reactivo de transfección “LipofectaminaTM Reagent” (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En las transfecciones con lipofectamina se usó una razón de masa de DNA (μg)/volumen de reactivo de transfección (μl) de 1:3. En primer lugar, se diluyó el reactivo de transfección en DMEM/F12 suplementado con 7,0 % suero fetal bovino sin antibiótico, ni antimicótico con un volumen final de 80 μl , incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el reactivo de transfección diluido en un tubo con el DNA a transfectar (también previamente diluido en el mismo volumen de DMEM/F12 suplementado con 7,0 % suero fetal bovino sin antibiótico, ni antimicótico), incubándose 15 minutos a temperatura ambiente para que se forme el complejo DNA-lípido catiónico. Finalmente, se agregó esta solución a placas con

células a un 60-80% de confluencia sobre cubreobjetos previamente tratados con una solución de poli-L-lisina (0,1 %), para fijar las células al cubreobjetos. Las células se dejaron 3 horas con el reactivo de transfección en DMEM/F12 carente de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico. Posteriormente se detuvo la transfección, mediante el cambio del medio de transfección a un medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 7%. Las células se analizaron 24 horas después de detenida la transfección, en un Microscopio Olympus IX70 equipado con una lámpara ARC Cairn y un monocromador Cairn Optoscan; la luz de emisión fue capturada por una cámara controlada por ORCA-ER Hamamatsu (Camera Controller).

Las células fueron expuestas a condiciones experimentales en tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH) (136 mM NaCl; 10 mM HEPES; 4,7 mM KCl; 1,25 mM MgSO₄; 1,25 mM CaCl₂; pH 7,4), suplementado con 5 mM de glucosa. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-26 °C).

La construcción de los gráficos y el análisis de los datos se hicieron utilizando el programa Sigma Plot 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. GENERACIÓN DE PROTEÍNA SPAK ETIQUETADA CON EL EPITOPO HA Y PROTEÍNAS RECOMBINANTES CR5-EGFP Y CR1-F84H-EGFP.

Con la finalidad de realizar los experimentos de localización celular y de co-inmunoprecipitación se generó la proteína quinasa SPAK de rata fusionada al epítipo de hemaglutinina (HA) y las proteínas de ClC-2 de cobayo fusionadas a la proteína fluorescente verde (EGFP).

Para obtener la secuencia codificante de la proteína quinasa SPAK fusionada al epítipo HA, se realizó una reacción de PCR, en la cual se incorporó un epítipo HA y un sitio de restricción *Xba I*, después del codón de término (figura 5). Los productos de PCR de 595 pb se visualizaron realizando una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,0 % (figura 6A). El fragmento purificado de PCR se subclonó en el vector pGEM-T Easy. Con el plasmidio resultante se transformaron bacterias competentes Dam-. Posteriormente el vector se purificó y se digirió con las enzimas *Bgl II* y *Xba I* (figura 6B). Este fragmento de 490 pb se ligó a un vector que contenía el cDNA de SPAK de rata inserto en el vector pCR3.1, previamente digerido con las mismas enzimas, así se obtuvo la construcción pCR3.1-rSPAK-HA.

Conjuntamente se subclonó un fragmento de la secuencia de gpClC-2 que codifica una variante de empalme, CR5 y un fragmento de secuencia de gpCLC-2 que incluye una mutación puntual, F84H, desde el plasmidio pCR3.1, para ser fusionados a la proteína fluorescente verde (EGFP) (figura 7). En efecto se realizaron las siguientes construcciones: pEGFP-N1-CR5 y pEGFP-N1-CR1-F84H, que expresan la proteína de fusión CR5-GFP y CR1-F84H-GFP.

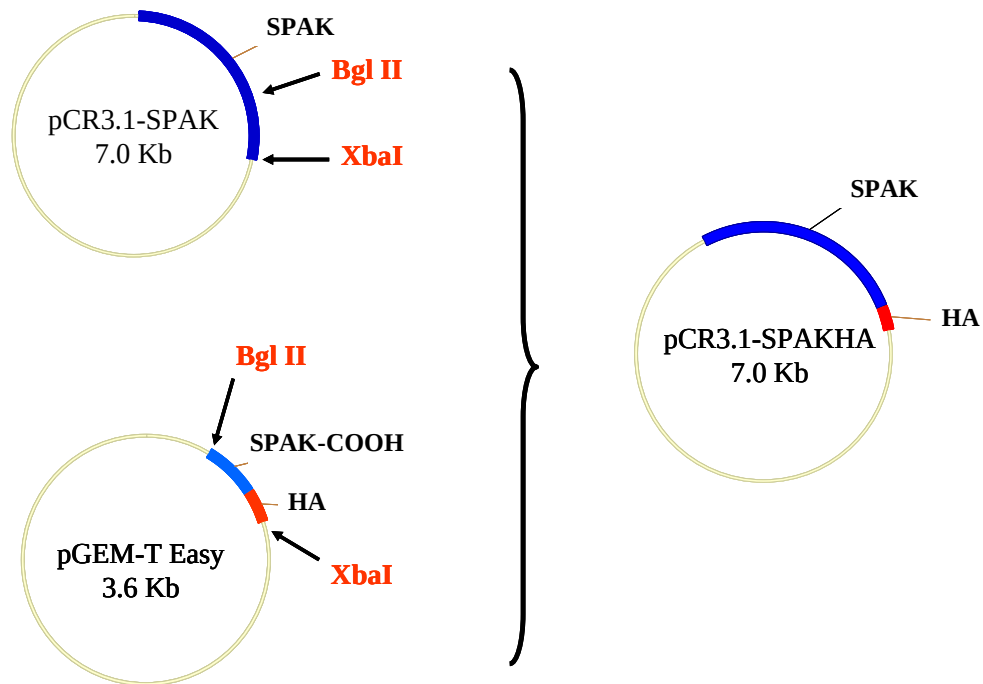


Figura 5. Esquema del procedimiento de subclonamiento del fragmento codificante de SPAK fusionado a HA, en el vector de expresión pCR3.1. Se observa un resumen del procedimiento experimental realizado para incorporar el epitopo HA a la secuencia codificante de SPAK en el vector de expresión pCR3.1. También se muestran los sitios de restricción en donde se incorporó el fragmento codificante de la quinasa.

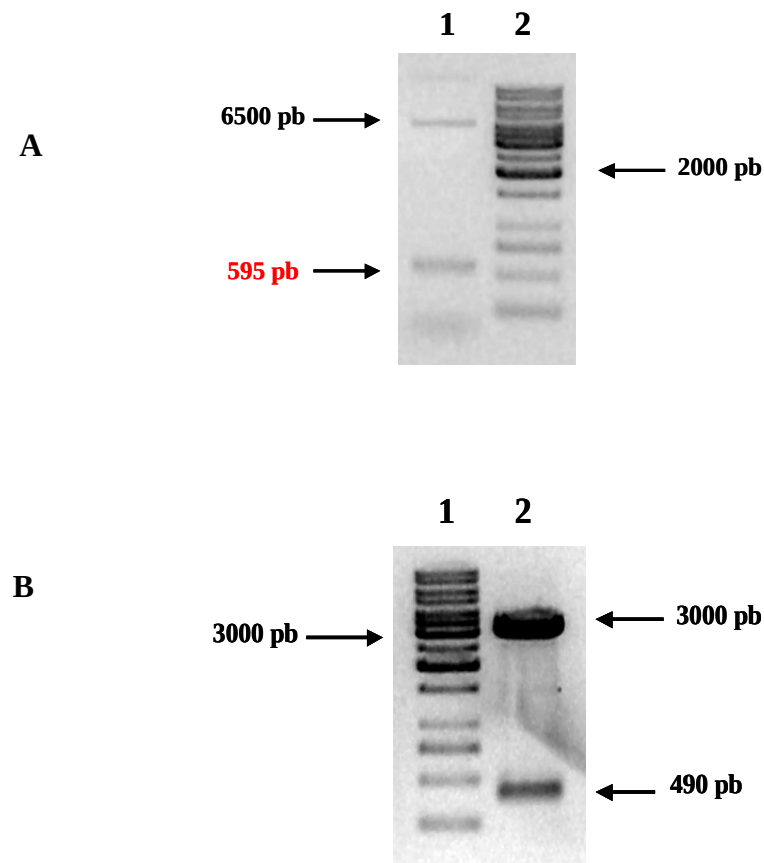


Figura 6. Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pGEM-T Easy-SPAK-HA. A) Se observa el producto de PCR de 595 pb, obtenido con los partidores mSPAKsen2 y SPAK-HAXbarev2, y pCR3.1-SPAK como templado. **B)** Se observa el plasmidio pGEM-T.Easy-SPAK-HA digerido con las enzimas de restricción *Bgl II* y *Xba I*, obteniéndose los fragmentos esperados de 3000 pb y 490 pb para la construcción. Los carriles 2 en A y 1 en B, corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

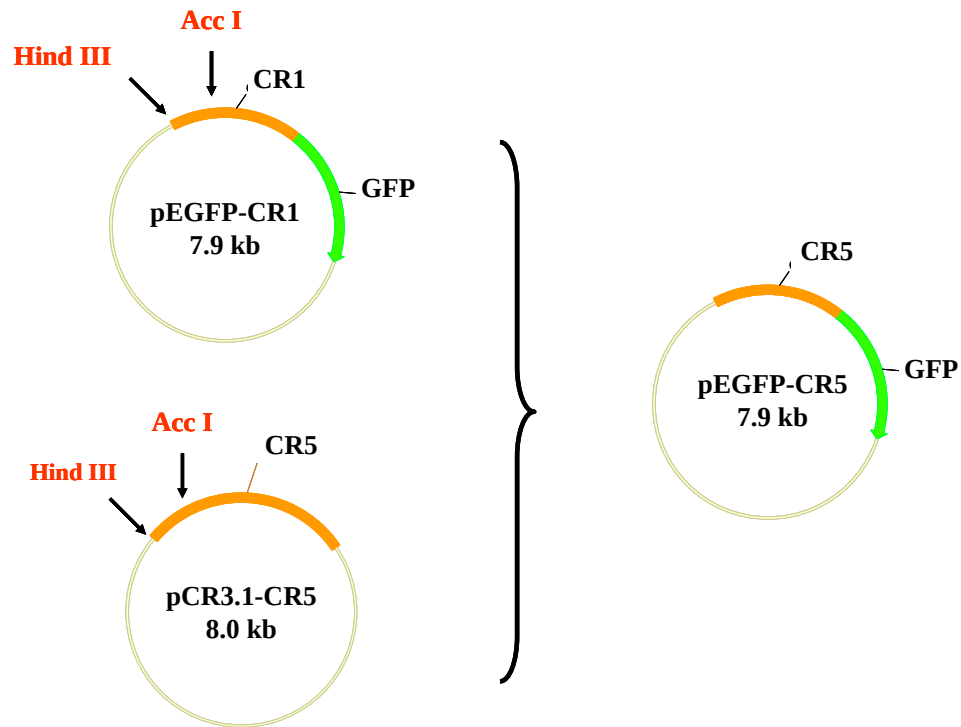


Figura 7. Esquema del procedimiento de subclonamiento del fragmento variable de CR1, en el vector de expresión pEGFP-N1-CR1. Se observa un resumen del procedimiento experimental realizado para subclonar la secuencia de CR1 que codifica una variante de *splicing* (CR5), fragmento de 1179 pb, en el vector de expresión pEGFP-N1. La misma estrategia se utilizó para subclonar la secuencia de CR1 que incluye una mutación puntual, F84H. También se muestran los sitios de restricción en donde se incorporó el fragmento codificante del canal. El fragmento de restricción que se obtuvo de CR1-F84H fue de 1221 pb.

Estas construcciones se realizaron a partir de la construcción pEGFP-N1–CR1, el cual se había generado previamente en nuestro laboratorio. La proteína fluorescente verde se fusionó en el extremo carboxilo terminal del canal, ya que experimentos previos realizados en el laboratorio con el ClC-2-EGFP humano no mostró diferencias electrofisiológicas respecto del canal silvestre.

Las digestiones con las enzimas de restricción *Hind III* y *Acc I* generaron dos fragmentos, que para el vector pEGFP-N1-CR1 medían 6703 y 1226 pares de bases, para el vector pCR3.1-CR5 medían 6931 y 1179 pares de bases, y para el vector pCR3.1-CR1-F84H medían 6889 y 1221 pares de bases. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, y se extrajeron las bandas de 6703 pb del vector pEGFP, 1179 pb del vector pCR3.1-CR5 y 1221 pb del vector pCR3.1-CR1-F84H (figura 8A). La ligación de estos fragmentos generó dos vectores de 7.900 pb aproximadamente que contenía el cDNA de ClC-2 con la variante de empalme y otro con la mutación puntual, fusionado a EGFP. Este vector se purificó y se le practicó un ensayo de restricción con las enzimas *Hind III* y *Bam HI*, obteniéndose los fragmentos esperados de 4700 y 3000 pb (figura 8B).

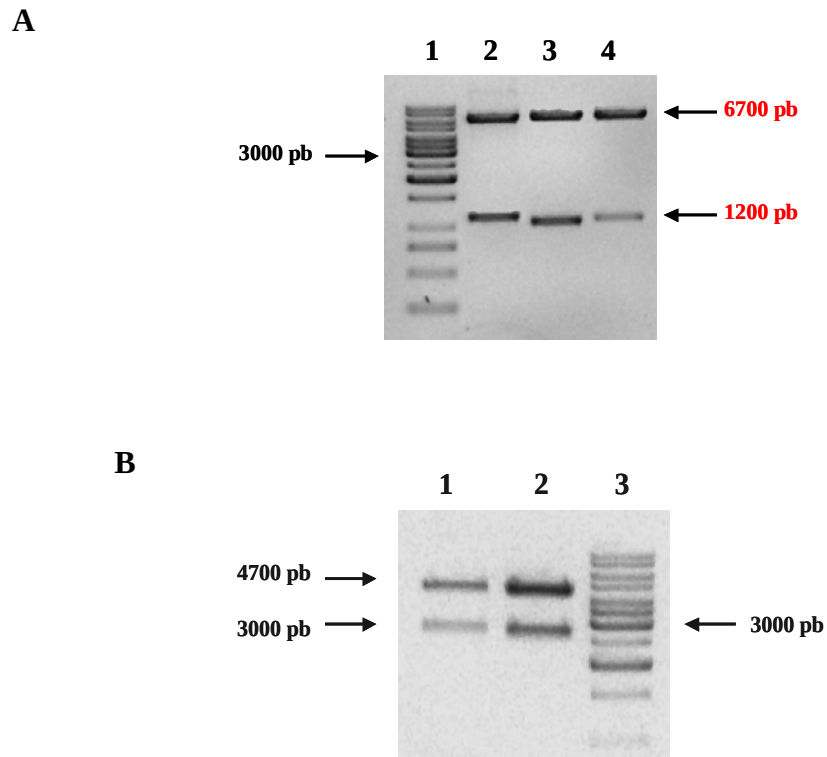


Figura 8. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1-CR5 y pEGFP-N1-CR1-F84H. **A)** Se observa en el carril 2 el plasmidio pEGFP-N1-CR1, en el carril 3 el plasmidio pCR3.1-CR5 y en el carril 4 el plasmidio pCR3.1-CR1-F84H; digeridos con las enzimas de restricción *Hind III* y *Acc I*, obteniéndose los fragmentos esperados para los constructos, carril 2: 6703 pb y 1221 pb, carril 3: 6931 pb y 1179 pb, carril 4: 6889 pb y 1216 pb. **B)** Se observa en el carril 1: el vector pEGFP-N1-CR1-F84H y en el carril 2: el vector pEGFP-N1-CR5, digeridos con las enzimas *Hind III* y *Bam HI*, obteniéndose los fragmentos esperados para los constructos de 4700 pb y 3000 pb. Los carriles 1 en A y 3 en B, corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

4.2. GENERACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES CR1-CFP, CR5-CFP, CR1-F84H-CFP Y EYFP-SPAK.

Con el propósito de realizar los experimentos de FRET (Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) se generaron proteínas recombinantes con la proteína fluorescente ciano (ECFP) y proteína fluorescente amarilla (EYFP). Los plasmidios pCR3.1-CR1, pCR3.1-CR5 y pCR3.1-CR1-F84H fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bpu1102 I*, para obtener la región variable de la proteína gpClC-2 (CR5 y CR1-F84H), obteniéndose un fragmento de aproximadamente 500 pb para los tres plasmidios (figura 9A). La región invariable de la secuencia codificante de la proteína gpClC-2 se obtuvo por la digestión del vector pEGFP-N1-CR1 con las enzimas de restricción *Bpu1102 I* y *BamH I*, obteniéndose un fragmento de 2500 pb (figura 9B). Este fragmento de 2500 pb se ligó con el resto de la secuencia codificante de CR1, para reconstituir la secuencia de la proteína y conjuntamente se ligaron al vector pECFP-N1, previamente digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bam HI* (figura 9C), y así se obtuvieron los constructos pECFP-N1-CR1, pECFP-N1-CR5 y pECFP-N1-CR1-F84H.

En la figura 10 se esquematiza los procedimientos experimentales realizados en la generación de las proteínas de gpClC-2 fusionada a las proteína fluorescente ciano (ECFP)

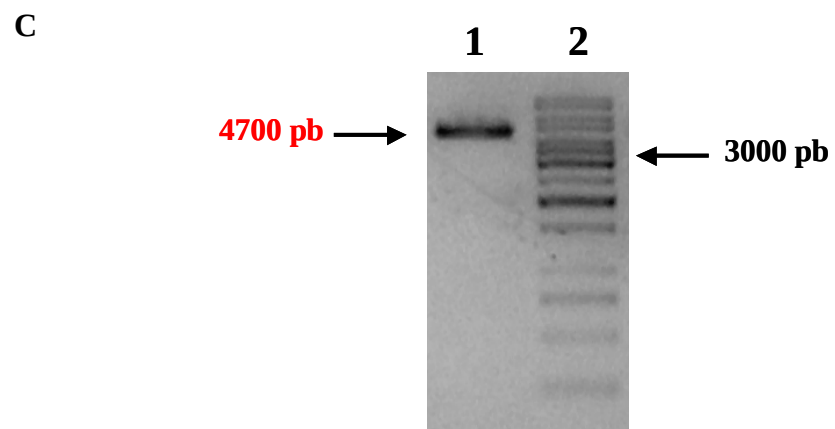
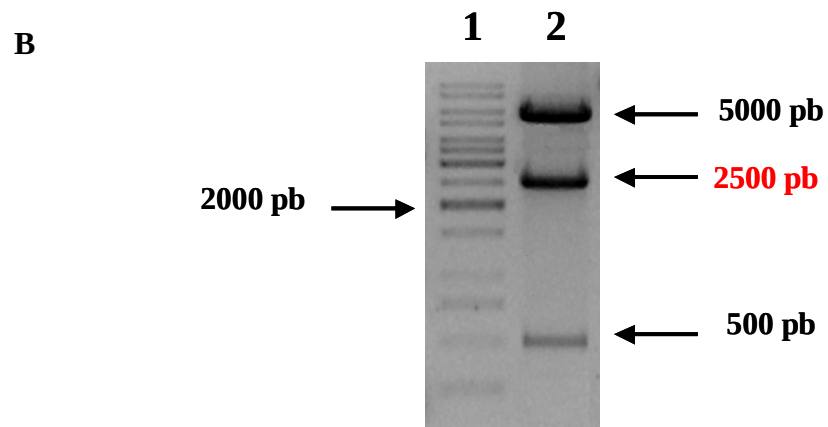
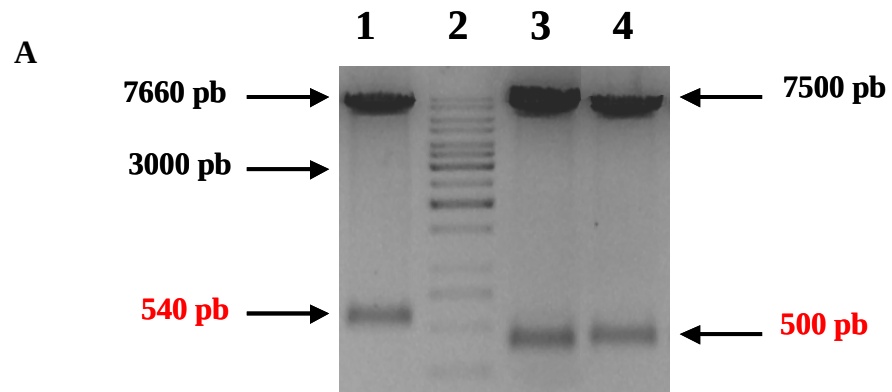


Figura 9. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1–CR1, pCR3.1-CR1, pCR3.1-CR5, pCR3.1-CR1-F84H y pECFP-N1. **A)** Se observan los plasmidios pCR3.1-CR1, pCR3.1-CR5 y pCR3.1-CR1-F84H digeridos con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bpu1102 I*, obteniéndose los fragmentos esperados para los constructos, carril 1: 7660 pb y 540 pb, carril 3 y 4: 7500 pb y 500 pb, de los plasmidios pCR3.1-CR5 y pCR3.1-CR1-F84H. **B)** Se observa el vector pEGFP-N1–CR1 digerido con las enzimas de restricción *Bpu1102 I* y *Bam HI*, obteniéndose los fragmentos esperados de 5000 pb, 2500 pb y de aproximadamente 500 pb. **C)** Se observa la digestión enzimática del plasmidio pECFP-N1 realizado con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bam HI*, obteniéndose un fragmento de 4700 pb y un pequeño fragmento de 38 pb que no se visualiza en el gel. Los carriles 2 en A, 1 en B y 2 en C, corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

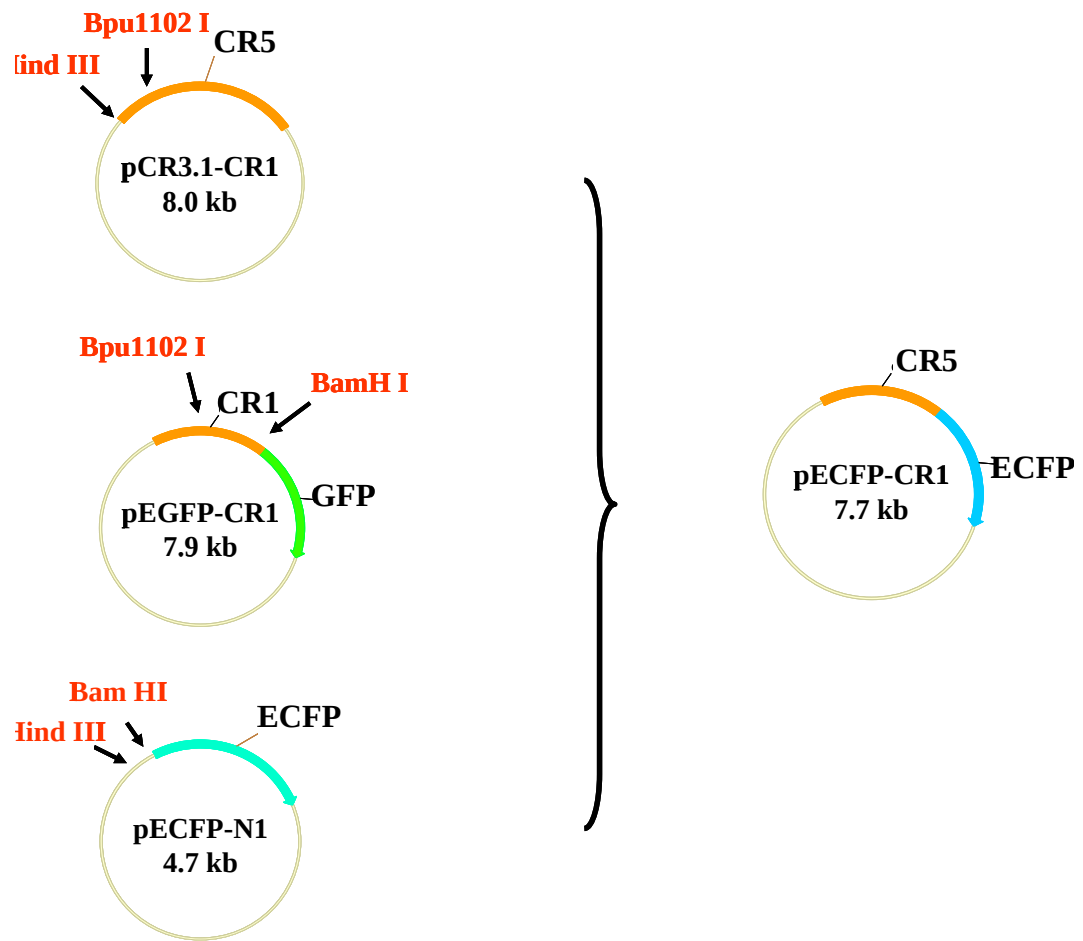


Figura 10. Esquema del procedimiento de subclonamiento de CR5 en el vector de expresión **pECFP-N1**. Se observa un resumen del procedimiento experimental realizado para subclonar la secuencia de CR5 en el vector de expresión pECFP-N1. La misma estrategia se utilizó para la construcción de F84H. También se muestran los sitios de restricción en donde se incorporó el fragmento codificante y la región variable de la secuencia de la proteína.

Con el propósito de obtener la secuencia codificante de la proteína SPAK fusionada a la proteína fluorescente amarilla (EYFP), se realizó una reacción de PCR, en la cual se incorporó un sitio de restricción *Eco RI*, río arriba del codón de inicio y ubicado río abajo del sitio de restricción *EcoR V*; los cuales permitirán clonar del producto de PCR en el vector de expresión. Los productos de PCR de 477 pb se visualizaron realizando una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 1,0 % (figura 11A). El fragmento purificado de la PCR se subclonó en el vector pGEM-T Easy. Con el plasmidio resultante se transformaron bacterias competentes DH5 α . Posteriormente el vector se purificó y se digirió con las enzimas *Eco RI* y *EcoR V* (figura 11B). Este fragmento de 477 pb se ligó a un vector que contenía el cDNA de SPAK de rata inserto en el vector pEYFP-C1, previamente digerido con las mismas enzimas (figura 11C), lográndose de esta forma la construcción pEYFP-C1-rSPAK-HA.

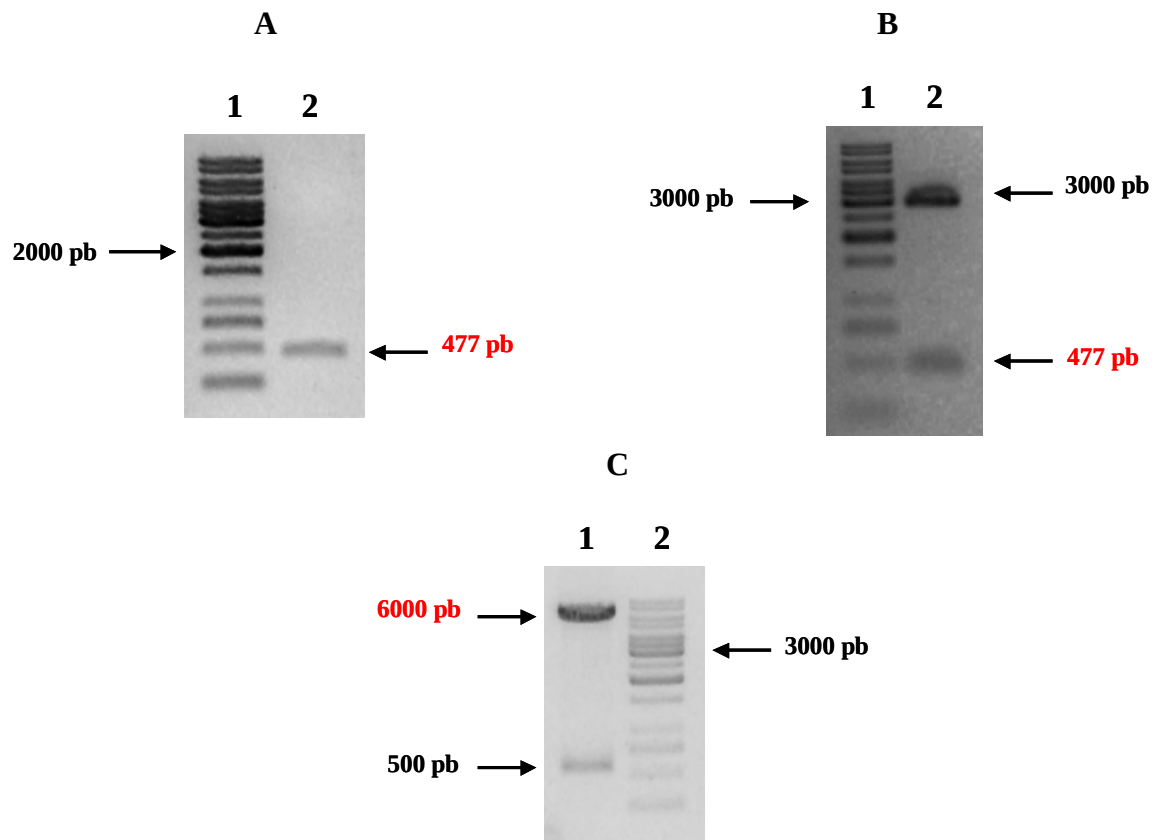


Figura 11. Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pEYFP-C1-SPAK. A) Se observa el producto de PCR de 477 pb, obtenido con los partidores EcoMETSpaksense y mPASKrev2, y pCR3.1-SPAK como templado. B) Se observa el plasmidio pGEM-T Easy con el producto de PCR digerido con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Eco RV*, obteniéndose los fragmentos esperados para la construcción de 3000 pb y 477 pb. C) Se observa la digestión del plasmidio pEYFP-C1-SPAK digerido con las enzimas de resticción *EcoRI* y *EcoRV*, obteniéndose los fragmentos esperados para la construcción de 6000 pb y un fragmento de 500 pb. Los carriles 1 en A, 1 en B y 2 en C, corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

4.3. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN CELULAR EN LÍNEA CELULAR HEK-293

4.3.1. Localización de las proteínas CR1-GFP, CR5-GFP y CR1-F84H-GFP

La línea celular HEK-293 fue transfectada en forma aguda con los plasmidios pEGFP-CR1, pEGFP-CR5 y pEGFP-CR1-F84H, expresándose por lo tanto en estas células las proteínas de fusión CR1-EGFP, CR5-EGFP y CR1-F84H-EGFP, respectivamente. Las preparaciones se analizaron 24 horas después de realizada la transfección.

Gracias a las propiedades fluorescentes de la proteína EGFP, se determinó la localización de las proteínas quiméricas mediante microscopia confocal, diferenciándose claramente las células transfectadas de las que no lo están debido a la fluorescencia verde emitida por ellas al ser excitadas con láser a 488 nm a un 30% de intensidad. Se muestran imágenes representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes, n corresponde al número de fotografías tomadas para cada experimento en el plano X-Y, observándose que en la línea celular HEK-293 tanto la proteína CR1-EGFP como CR5-EGFP y CR1-F84H-EGFP presentaron expresión de carácter punteado en la membrana, y carácter vesicular en el intracelular (figura 12).

4.3.2. Inmunolocalización de la proteína SPAK-HA

Con el objetivo de determinar la localización de la proteína quinasa SPAK en la línea celular HEK-293, se realizaron experimentos de inmunolocalización de la proteína etiquetada con

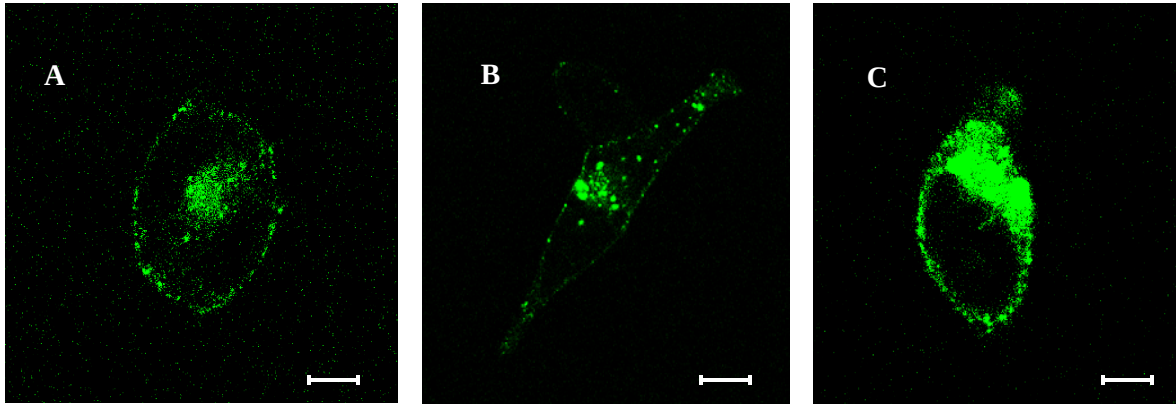


Figura 12. Localización celular de CR1-EGFP, CR5-EGFP y F84H-EGFP en la línea celular HEK-293. Las células se cultivaron en cubre objetos y se transfectaron con pEGFP-CR1, pEGFP-CR5 y pEGFP-CR1-F84H, analizándose 24 horas post transfección, mediante microscopia confocal. Se puede observar la localización de membrana y expresión punteada en **A)** CR1-EGFP (n= 5), **B)** CR5-EGFP (n= 8) y **C)** CR1-F84H-EGFP (n= 5). Las barras representan 10 μ m.

el epítipo HA (hemaglutinina). Las células se sembraron en cubre objetos de 12 mm de diámetro, bajo las mismas condiciones utilizadas para los experimentos de transfecciones transitorias. Se tranfectó el plasmidio pCR3.1-rSPAK-HA y luego de 24 horas post transfección se realizó la inmunolocalización de la proteína SPAK-HA, utilizando como anticuerpo primario anti-HA de rata (clon 3F10) y como anticuerpo secundario Alexa Flúor 568, mediante microscopia de fluorescencia y confocal, utilizando para éste último el láser de 543 nm para excitar las muestras. En las imágenes se observa que la proteína SPAK tiene una localización citoplasmática uniforme (figura 13)

4.3.3. Co-detección de CR1-EGFP Y SPAK-HA

Con el propósito de determinar el efecto que causa en la expresión de la proteína SPAK la presencia del canal CR1, con respecto a su localización citoplasmática, se realizó un ensayo de colocalización mediante microscopia confocal.

Las células se sembraron en cubreobjetos de 25 mm de diámetro y se co-transfectaron con CR1-EGFP y pCR3.1-rSPAK-HA bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente, y se realizó la inmunodetección de SPAK-HA 24 horas post transfección. En todas las células analizadas, se observó co-localización de la señal de CR1 con SPAK parcialmente en zonas punteadas, posiblemente a nivel de la membrana. En la figura 14 se muestra una imagen representativa de los experimentos descritos.

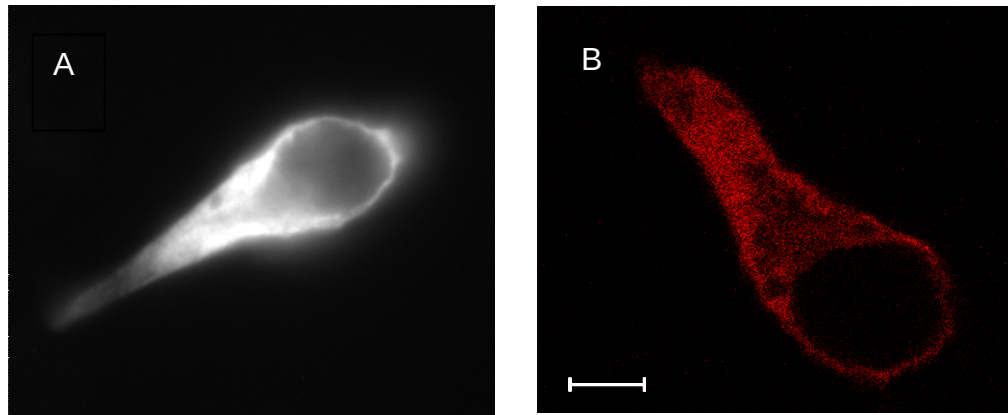


Figura 13. Immunolocalización de la proteína SPAK-HA. Las células se sembraron en cubreobjetos y se realizó la inmunolocalización de la proteína SPAK-HA, 24 horas post transfección. Se observa la expresión citoplasmática de la proteína SPAK en **A)** por microscopia de fluorescencia (n= 3) y en **B)** por microscopia confocal en un plano X-Y (n= 3). La barra representa 5 µm.

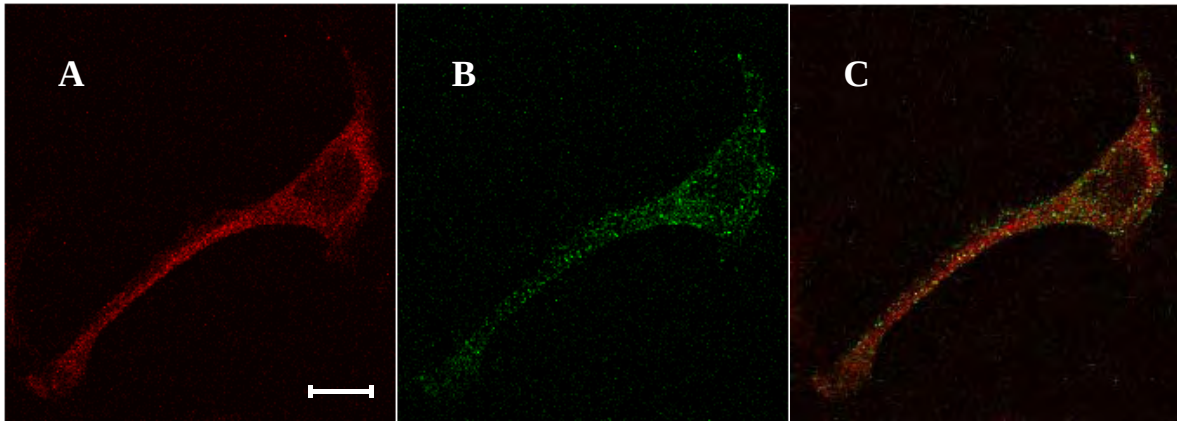


Figura 14. Co-detección de CR1 y SPAK. Las células se sembraron en cubreobjetos y la inmunolocalización de SPAK-HA se realizó 24 horas post transfección. No se observa co-localización de CR1-EGFP y SPAK-HA en ninguna de las células estudiadas. Se puede observar en **A)** la localización citoplasmática de SPAK-HA y en **B)** la expresión punteada en membrana de CR1-EGFP. La imagen en **C)** corresponde a la colocalización respectiva (n= 3). La barra representa 10 μm .

4.4. ESTUDIO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO* MEDIANTE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Como primera aproximación para el estudio de interacción entre el canal ClC-2 de cobayo y la proteína quinasa SPAK de rata, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. Esencialmente, estos experimentos se puede dividir en 4 etapas principalmente: a) extracción de proteínas; b) incubación de las proteínas marcadas con los anticuerpos primarios, c) precipitación del complejo antígeno-anticuerpo (inmunoprecipitación) con la ayuda de proteína A o G asociada a una resina particulada insoluble y d) análisis de las proteínas precipitadas por Western blot.

Previo al montaje de la técnica se analizaron las proteínas totales de la línea celular HEK-293 transfectada transitoriamente con los plasmidios pCR3.1-rSPAK-HA, pEGFP-CR1, pEGFP-CR5 y pEGFP-CR1-F84H. Una vez separadas las proteínas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, las que a continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario sea anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata o anti-GFP policlonal de conejo según correspondía. Posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo, anti-IgG conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) y detectadas mediante quimioluminiscencia. Como control positivo del anticuerpo anti-GFP se utilizaron extractos de proteínas totales de células HEK-293 transfectadas con el receptor de transferrina (TFR) fusionado a EGFP. Como se puede apreciar en la figura 15, los anticuerpos reconocen específicamente solo al epítipo HA y la proteína fluorescente verde, sin observarse reacción cruzada con proteínas inespecíficas.

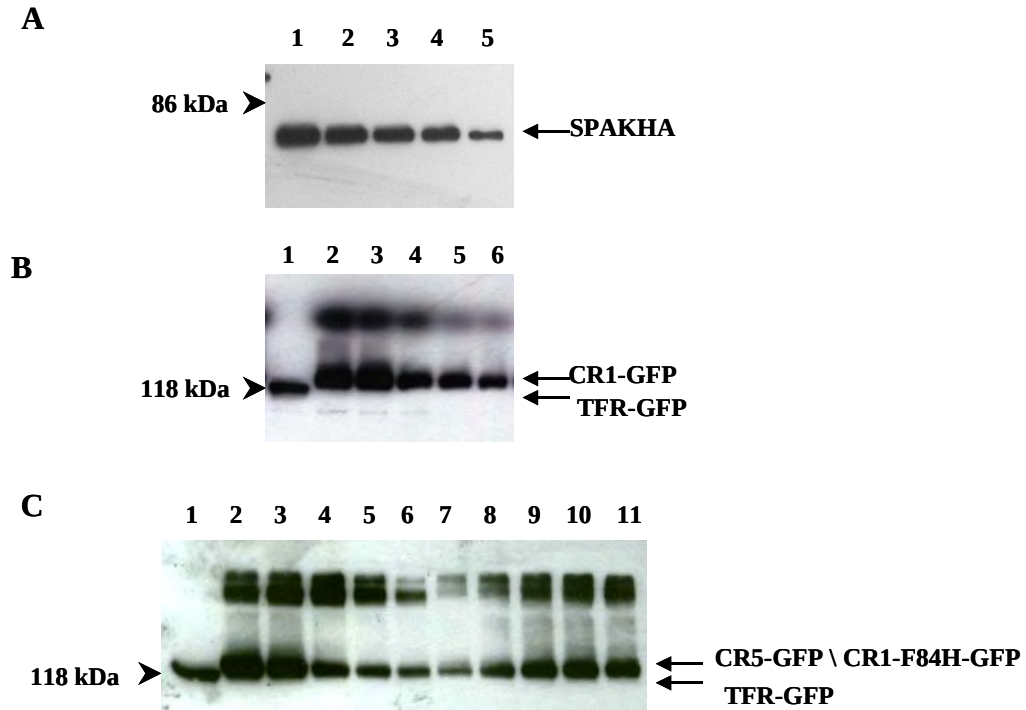


Figura 15. Análisis de Western blots de SPAK-HA, CR1-GFP, CR5-GFP y CR1-F84H-GFP. Células HEK-293 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCR3.1-rSPAK-HA, pEGFP-CR1, pEGFP-CR5 y pEGFP-CR1-F84H. Concentraciones crecientes de proteínas totales fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE. El anticuerpo anti-HA reconoce una banda de ~60 kDa y el anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~120 kDa para CR1, CR5 y CR1-F84H y de ~115 kDa para el receptor de transferrina (TFR) utilizado como control positivo. **A)** línea 1-5: SPAK-HA (60 µg, 50 µg, 40 µg, 30 µg y 20 µg); **B)** línea 1: receptor de transferrina (50 µg), línea 2-6: CR-1 (60 µg, 50 µg, 40 µg, 30 µg y 20 µg) y **C)** línea 1: receptor de transferrina (50 µg), línea 2-6: CR-5 (60 µg, 50 µg, 40 µg, 30 µg y 20 µg) y línea 7-11: CR1-F84H (20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg y 60 µg). Las puntas de flecha indican marcador de proteínas.

Es de destacar la presencia de una banda de ~200 kDa detectada con el anticuerpo anti-GFP en los análisis de Western blot CR1, CR5 y CR1-F84H. De acuerdo a antecedentes reportados previamente en la literatura (Bear *et al.*, 2006), esta banda correspondería muy posiblemente a un dímero del canal ClC-2.

Para montar la técnica de co-inmunoprecipitación se realizaron una serie de controles con el fin de obtener las mejores condiciones experimentales. En primera instancia se evaluó el tampón de lisis, para lo cual se discriminó entre el uso de detergentes iónicos y no iónicos. Todos los tampones de lisis probados fueron suplementados con inhibidores de proteasas; leupetina 1 µg/µl, aprotinina 1µg/µl, PMSF 1 mM , 10 mM NaF y ortovanadato sódico 1 mM. En la tabla 1 se detalla la composición de cada tampón de lisis evaluado.

Células HEK-293 se co-transfectaron por cuadruplicado con CR1-EGFP y pCR3.1-rSPAK-HA bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente, y se procedió a la extracción de proteínas utilizando para cada placa de células un tampón de lisis distinto, para luego llevar a cabo el procedimiento de Western blot. La membrana se cortó en dos, para separar la presencia de SPAK y CR1 en la membrana e incubarlas cada uno con los anticuerpos correspondientes, anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata y anti-GFP policlonal de conejo, respectivamente (figura 16). El análisis de Western blot revela que el tampón de lisis III, que corresponde a una condición menos astrigente, dado que no posee detergentes iónicos adicionales y solo posee un detergente no iónico que se caracteriza por tener una buena solubilización y ser medianamente denaturante, otorga la mejor condición basado en el hecho de que un tratamiento medianamente suave permite la obtención de una buena señal tanto para SPAK-HA como para CR1-EGFP. Aunque la señal es tenue, no se favorece la presencia de ninguna de las dos conformaciones de CR1, ni como monómero, ni como del putativo dímero del canal ClC-2.

Tampón de lisis I (pH 8,0)	Tampón de lisis II (pH 8,0)	Tampón de lisis III (pH 7,4)	Tampón de lisis IV (pH 7,5)
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM HEPES
150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
1 % Nonidet P-40	1 % Nonidet P-40	1 % Nonidet P-40	1 % Tritón X-100
1 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM EGTA
1 % DOC	0.5 % DOC		10 % glicerol
	0.1 % SDS		10 mM MgCl ₂
Inh. de proteasas	Inh. de proteasas	Inh. de proteasas	Inh. de proteasas

Tabla 1. Detalle de la composición de cada tampón de lisis.

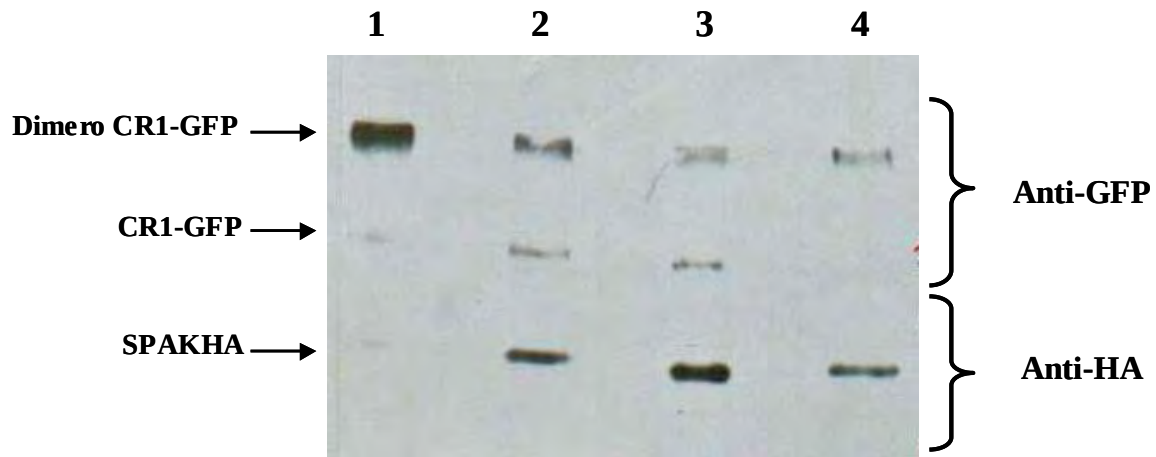


Figura 16. Análisis de Western Blot de prueba para los tampones de lisis. Células HEK-293 se co-transfectaron con CR1-EGFP y pCR3.1-rSPAK-HA. Cada placa de células se procesó con un tampón de lisis distinto (las líneas de 1 al 4 denotan los tampones de lisis I, II, III y IV según la tabla 3). La membrana se dividió en dos partes para detectar cada proteína con su respectivo anticuerpo; la parte superior de la membrana se inmunodetectó con el anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo y la parte inferior con el anticuerpo anti-HA (3F10) monoclonal de rata. Se cargaron 50 μ g de extracto de proteínas totales en cada posillo. El anticuerpo anti-HA reconoce una banda de ~ 60 kDa y el anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~ 120 kDa para CR1.

Otra condición importante de evaluar al momento de montar la técnica de co-inmunoprecipitación fue la elección del tampón de corrida utilizado en la electroforesis y las condiciones de denturación de las proteínas. Se probaron cuatro condiciones de denaturación, diferenciadas en tiempo y temperatura al momento de la incubación de las muestras proteicas resuspendidas en tampón de corrida. Asimismo se avaluó la diferencia de pH del tampón de corrida, entre un pH más ácido a uno más básico. En la tabla 2 se describe la diferencia entre los tampones de corrida probados.

Se transfectaron células HEK-293 con CR1 fusionado a EGFP y 24 horas post transfección se realizó la extracción de proteínas. Posterior a la medición de la muestra de proteínas se utilizaron 50 μ g de proteínas para probar cada condición de tiempo, temperatura y tampón de corrida (figura 17). Cada tampón de corrida se evaluó bajo las mismas condiciones de denaturación; sin tratamiento de temperatura, 1 hora a 37°C, 10 minutos a 65°C y 5 minutos a 100°C.

De acuerdo al análisis de Western blot, una condición de pH más básico, como el que presenta el tampón de corrida II favorece la presencia del monómero de CR1, con respecto a la condición más ácida del tampón de corrida I que permite la presencia del putativo dímero del canal. Por otro lado, tanto la condición de denaturación de proteínas por 1 hora a 37°C, como por 10 minutos a 65°C son óptimas para la obtención de una buena señal del canal CR1, a diferencia de lo que se observa en condiciones extremas de denaturación, ya sea sin tratamiento de calor o por 5 minutos a 100°C, lo que genera una señal más tenue.

Tampón de corrida I	Tampón de corrida II
350 Mm Tris -HCl (pH 6.8)	240 Mm Tris -HCl (pH 8.8)
36 % glicerol	20 % glicerol
10,28 % SDS	5,6 % SDS
0,04 % azul de bromofenol	0,2 % azul de bromofenol
100 mM DTT	100 mM DTT

Tabla 2. Detalle de la composición de cada tampón de corrida. En ambos tampones de corrida el DTT (Ditiotreitol) fue incorporado al momento de utilizar.

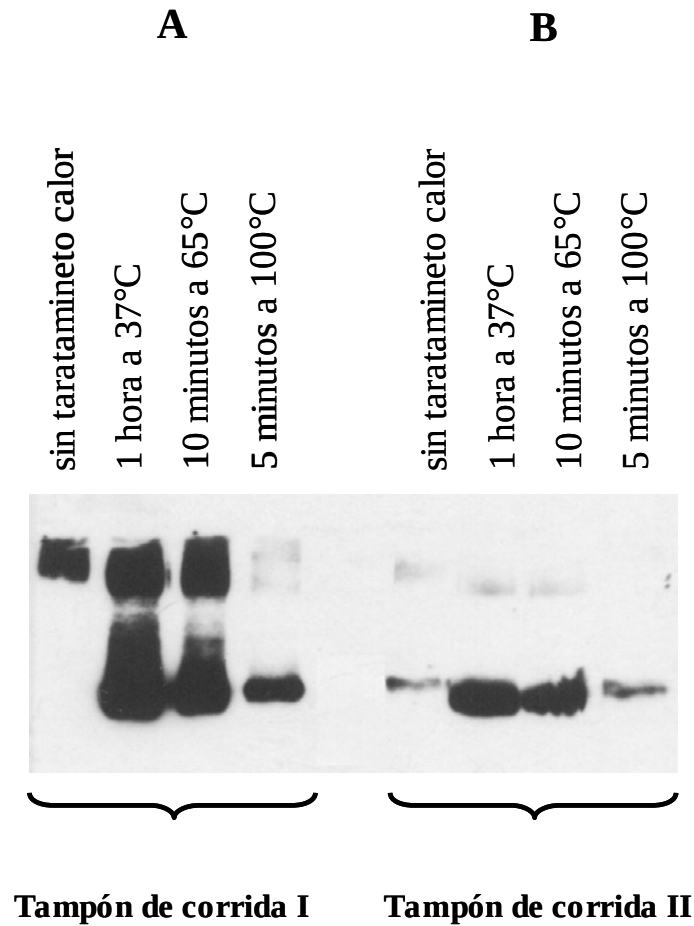


Figura 17. Análisis de Western blot para la evaluación de las condiciones de denaturación de proteínas y tampón de corrida. Se transfectaron células HEK-293 con CR1-EGFP y 24 horas post transfección se realizó la extracción de proteínas. Cada línea contiene 50 μ g de extracto de proteínas totales. El anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~120 kDa para CR-1. **A)** las muestras de proteínas se trataron con el tampón de corrida I (pH 8,8) y **B)** con tampón de corrida II (pH 8,8). Ambos grupos de proteínas se trataron con las mismas variaciones de denaturación; línea 1: sin tratamiento de temperatura, línea 2: 1 hora a 37°C, línea 3: 10 minutos a 65°C y línea 4: 5 minutos a 100°C.

La tercera condición evaluada para el montaje de la técnica y que fue clave en su desarrollo, debido a que en primera instancia demostró la interacción de proteínas entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK, fue la evaluación de la solución de lavado. Por lo cual se probaron distintas concentraciones de sal y la presencia o ausencia de detergentes no iónicos. En la tabla 3 se indica el detalle de cada tampón de lavado probado.

Las células HEK-293 se co-transfectaron por cuadruplicado con los plasmidios CR1-EGFP y pCR3.1-rSPAK-HA bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente, transcurrido 24 horas post transfección se realizó el ensayo de co-inmunoprecipitación.

El experimento se ejecutó análogamente en cada muestra y solo varió al momento de lavar el complejo inmunoprecipitado para probar las distintas condiciones. La condición de lavado con tampón de lisis, que contiene 150 mM de NaCl, se dejó por 15 minutos a 4°C y en agitación, mientras que el mismo tampón de lisis, pero con 350 mM de NaCl, solo se mezcló por inversión y se centrifugó inmediatamente. En el caso de los tampones PBS y TS, se aplicó el mismo sistema de lavado de esta última. Cada lavado se realizó en triplicado y seguido de una centrifugación a 14.000g por 1 minuto. Posterior a este paso se llevó a cabo el Western blot. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti-HA (clon 3F10) monoclonal y la proteína G PLUS-agarosa, mientras que el Western blot se realizó detectando con el anticuerpo primario anti-GFP policlonal y como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

Como muestra la figura 18, tres de cuatro condiciones de lavado fueron favorables para el resultado esperado, una banda detectada por el anticuerpo anti-GFP a la altura del marcador de proteínas de 118 kDa, lo que se corrobora con la presencia de la proteína CR1-EGFP detectada en los lisados celulares, los cuales corresponden solo al análisis de Western blot de los extractos de

Tampón de Lisis (pH ,4)	Tampón de Lisis (pH 7,4)	Tampón PBS (pH 7,4)	Tampón TS (pH 7,5)
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	137 mM NaCl	20 Tris-HCl
150 mM NaCl	350 mM NaCl	2.7 mM KCl	150 mM NaCl
1% Igepal	1% Igepal	10 mM Na ₂ HPO ₄	1.5 mM CaCl
1mM EGTA	1mM EGTA	2 mM KH ₂ PO ₄	1.5 mM MgCl

Tabla 3. Descripción de los tampones de lavado.

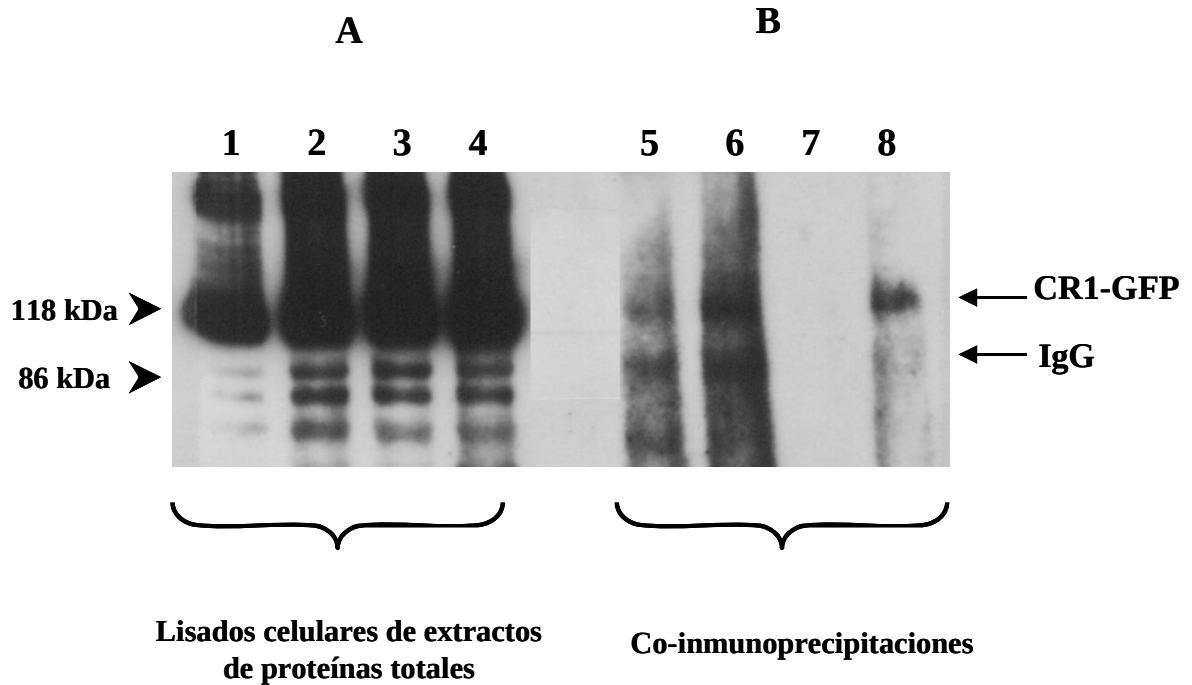


Figura 18. Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de SPAK y CR-1. Las células HEK-293 se co-transfectaron con los plasmidios CR1-EGFP y pCR3.1-rSPAK-HA. La co-inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata y la proteína G PLUS-agarosa. El Western blot se realizó utilizando como anticuerpo primario anti-GFP policlonal de conejo y como anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP). El anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~120 kDa para CR1. **A)** lisados celulares de extractos de proteínas totales y **B)** experimentos de co-inmunoprecipitación. Línea 1-4: lisados extractos de proteínas totales de los experimentos a, b, c y d; línea 5: experimento a lavado con tampón de lisis (150 mM NaCl); línea 6: experimento b lavado con tampón de lisis (350 mM NaCl); línea 7: experimento c lavado con tampón PBS; línea 8: experimento d lavado con tampón TS. Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

proteínas totales aislados antes de comenzar el proceso de co-inmunoprecipitación. Sin embargo, se obtienen muchas bandas inespecíficas acompañando a las bandas detectadas por el anticuerpo anti-GFP en el bloque de los lisados celulares. Este número disminuye en el bloque de las bandas correspondientes a las proteínas co-inmunoprecipitadas, donde se observa una banda cercana al marcador de proteínas de ~86 kDa que podría corresponder a una cadena pesada y otra liviana de la IgG de rata, que en conjunto suman ~80 kDa.

Tanto una condición de lavado suave como más fuerte, sea con detergente, como con mayor o menor fuerza iónica (concentración de sal) permitió determinar que CR1 y SPAK co-inmunoprecipitan. Sin embargo el lavado realizado con un tampón suave como TS permitió obtener una señal más limpia, sin bandas inespecíficas.

Una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación para determinar la posible interacción entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK. Se cotransfectaron células HEK-293 con los siguientes pares de plásmidos: pCR3.1-rSPAK-HA y pEGFP-CR1, pCR3.1-rSPAK-HA y pEGFP-CR5. La inmunoprecipitación se realizó precipitando la proteína SPAK-HA con la proteína G PLUS-agarosa y el anticuerpo anti-HA (clon 3F10) monoclonal, mientras que el Western blot se realizó detectando a la proteína asociada a SPAK, CR1-EGFP, con el anticuerpo primario anti-GFP policlonal y como anticuerpo secundario IgG anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

Como se puede observar en la figura 19, se logró co-inmunoprecipitar el canal CR1 con la proteína quinasa SPAK, no obstante co-inmunoprecipitó con la variante de empalme CR5, que carece de la secuencia de unión a SPAK. Por lo cual se demuestra que tanto el canal CR1 como CR5 interaccionan bajo un sistema *in vitro* con la proteína quinasa SPAK.

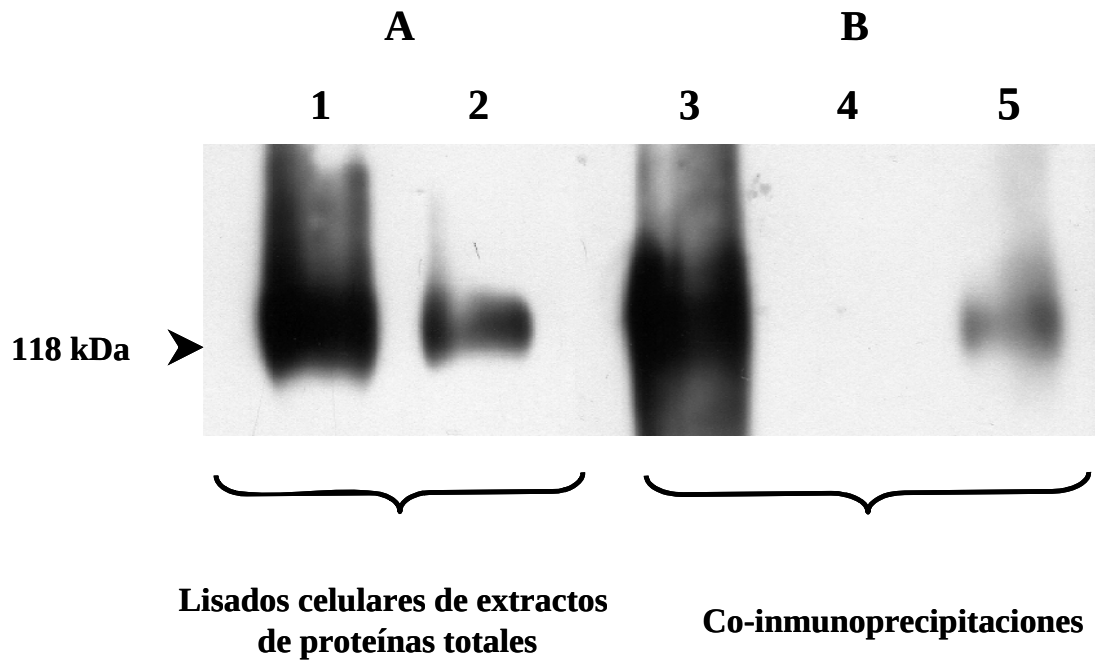


Figura 19. Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de SPAK, CR1 y CR5. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plasmidios: pCR3.1-rSPAK-HA y pEGFP-CR1, pCR3.1-rSPAK-HA y pEGFP-CR5. Para co-inmunoprecipitar se utilizó el anticuerpo anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata y la proteína G PLUS-agarosa. El Western blot se realizó utilizando como anticuerpo primario anti-GFP policlonal de conejo y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP. El anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~120 kDa para CR1. **A)** lisados celulares de extractos de proteínas totales y **B)** experimentos de co-inmunoprecipitación. Línea 1-2: lisado de extractos de proteínas totales de los experimentos a y b. Línea 3: experimento a de co-inmunoprecipitación de CR1-EGFP y SPAK-HA; línea 4: tampón de carga; línea 5: experimento c de co-inmunoprecipitación de CR5-EGFP y SPAK-HA (n= 3). Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

4.5. ESTUDIO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VIVO* MEDIANTE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FLUORESCENCIA (FRET)

Un aspecto importante del trabajo a realizar, era la demostración que la interacción entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK podía ser observada también *in vivo*. Con este fin, se implementó la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET), la cual permite la evaluación con alta sensibilidad de la interacción entre dos proteínas dentro de una célula. Esta técnica se implementó en células HEK-293.

Como primer paso, se evaluó la expresión de los plasmidios en células HEK-293, para lo cual las células se sembraron en cubre objetos en las mismas condiciones que las utilizadas para los experimentos de transfecciones transitorias descritos anteriormente, con los plasmidios CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP, y pasado 24 horas fueron fijadas. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje DAKO.

Las células fueron evaluadas mediante microscopía confocal utilizando el láser de 458 nm para excitar las muestras. Para estos fines se utilizó el microscopio confocal Leica TCS₄, facilitado gentilmente por la Universidad Austral de Chile.

Como se observa en la figura 20 las proteínas CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP se expresan en las células HEK-293 y presentan una distribución de membrana, acorde con las observaciones anteriores, de estas proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde (EGFP) (figura 12).

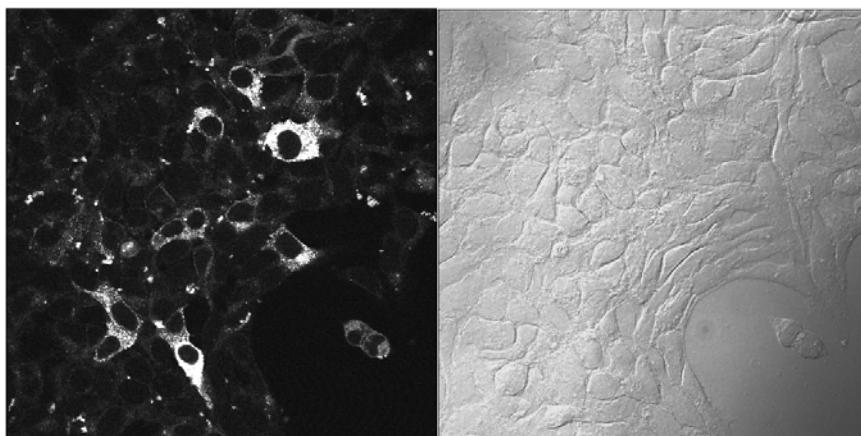
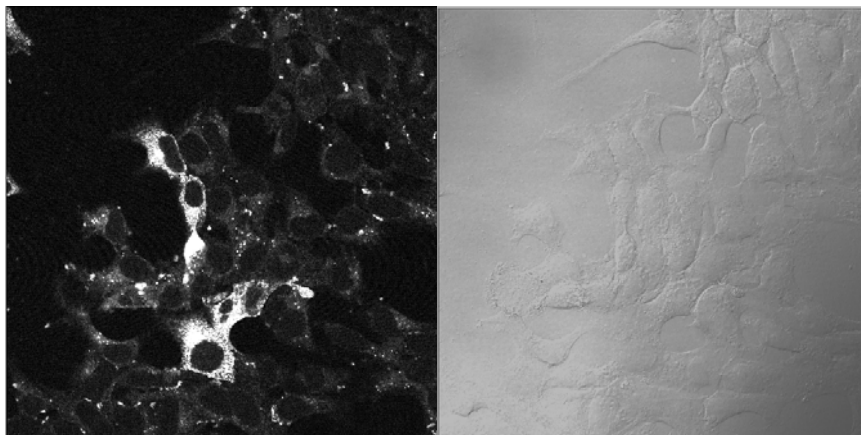
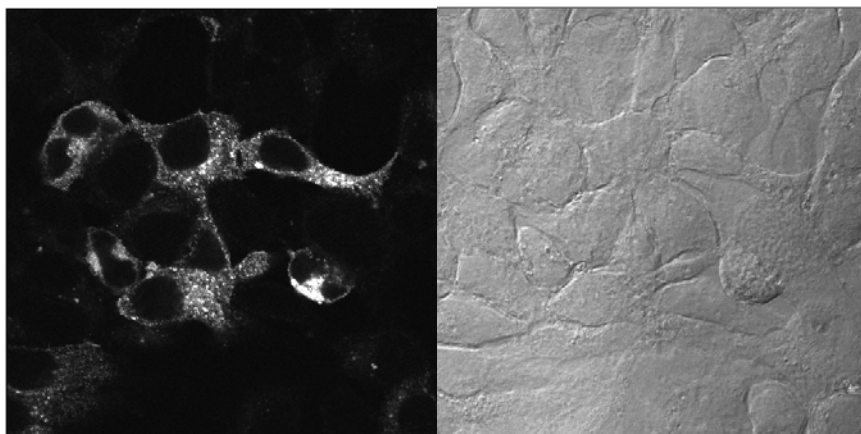
A**B****C**

Figura 20. Localización celular de CR1-ECFP, CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP en la línea celular HEK-293. Las células se cultivaron en cubreobjetos y se transfectaron agudamente con pECFP-CR1, pECFP-CR5 y pECFp-F84H. Transcurridas 24 horas después de la tranfección las células fueron fijadas y analizadas mediante microscopia confocal excitando con un láser de 458 nm . Se puede observar la localización de membrana, no uniforme y grumosa en **A)** CR1-ECFP (n= 6), **B)** CR5-ECFP (n= 3) y **C)** CR1-F84H-ECFP (n= 3). En los paneles a la derecha se observan las imágenes de transmitancia.

La expresión de la proteína EYFP-SPAK fue evaluada en la línea celular HEK-293 mediante microcopia de fluorescencia, para lo cual las células se sembraron en cubreobjetos de 25 mm de diámetro, bajo las mismas condiciones utilizadas para los experimentos de transfecciones transitorias descritos anteriormente, con el plasmidio pEYFP-C1-rSPAK. Las preparaciones se analizaron 24 horas después de realizada la transfección.

Como se aprecia en la figura 21, la proteína quinasa SPAK fusionada a la proteína fluorescente amarilla (EYFP) presenta una distribución citoplasmática, uniforme, análoga a las imágenes obtenidas de SPAK fusionada al epitopo HA (figura 13, A).

Una vez evaluada la expresión de estas proteínas en células HEK-293 se procedió a tomar los espectros de excitación de cada proteína de fusión de forma individual. Con este ensayo se pretendía evaluar a que longitud de onda de excitación se obtenía la máxima intensidad de fluorescencia, tanto para la proteína fusionada EYFP, como para la proteína fusionada a ECFP, para lo cual se consideró un intervalo de longitudes promedio de excitación.

La fluorescencia fue medida en regiones de interés (*Región Of Interest*: ROIs) posicionadas sobre las células, utilizando un Microscopio Olympus IX70, equipado con una lámpara ARC Cairn y un monocromador Cairn Optoscan; la luz de emisión fue capturada por una cámara controlada por ORCA-ER Hamamatsu (Camera Controller). La señal de fondo (*background*) se midió colocando ROIs en lugares sin células y este valor fue sustraído a las mediciones de fluorescencia proveniente de los ROIs celulares colocados sobre las células.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro, los cuales fueron montados sobre cámaras abiertas construidas por BioJSP (Santiago, Chile) y expuestas a condiciones experimentales en tampón KRH, suplementado con 5 mM de glucosa.

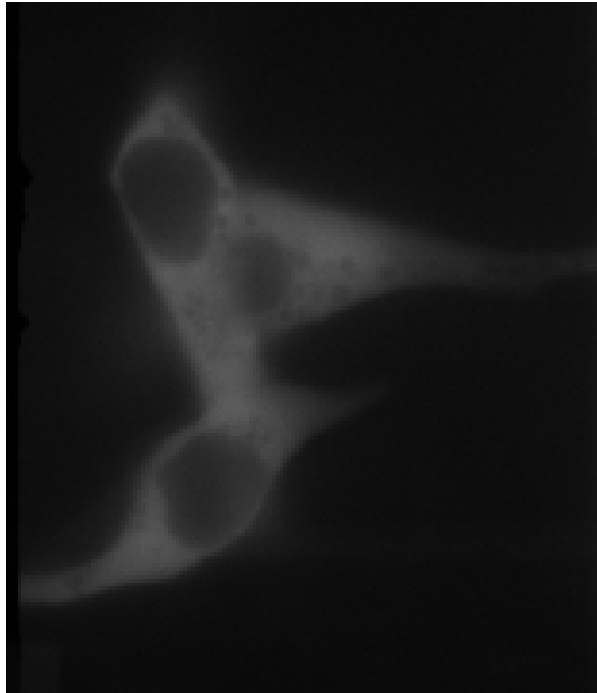
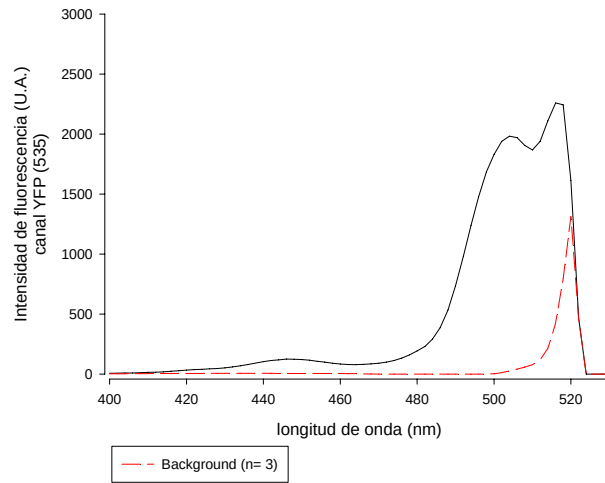


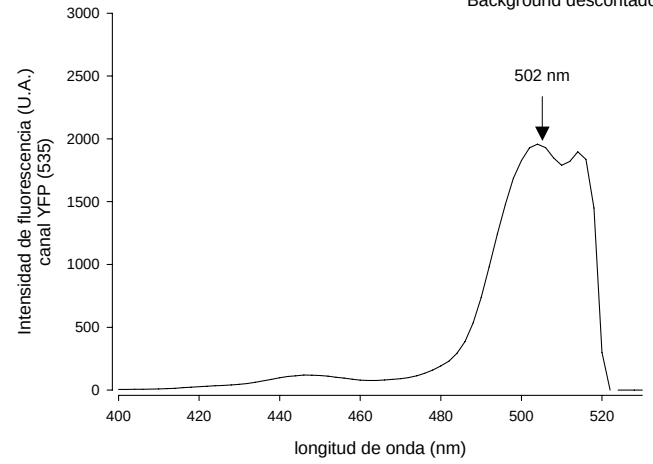
Figura 21. Localización celular de EYFP-SPAK en la línea celular HEK-293. Las células se sembraron en cubreobjetos y se tranfectaron con el plasmidio pEYFP-C1-rSPAK, luego de 24 horas post transfección se analizaron mediante microscopia de fluorescencia. Se observa la expresión citoplasmática de la proteína SPAK.

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-26°C). La construcción de los gráficos y el análisis de los datos se hicieron utilizando el programa Sigma Plot 9.0. En los paneles superiores de la figura 22 se representa a través de los gráficos, intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la fluorescencia emitida en cada longitud de onda, partiendo de 400 nm hasta 601 nm, a una distancia medida de cada 3 nm, con un ancho de banda (*Bandwidth*) de ± 8 y excitando las células por un tiempo máximo de 250 milisegundos (mseg). Se determinó un máximo de excitación de 502 nm para EYFP-SPAK. En el caso de CR1-ECFP (paneles inferiores de la figura 22) se midió desde una longitud de onda de 390 nm hasta 531 nm, cada 3 nm. Se utilizó una condición de ancho de banda de ± 8 y las células se excitaron por un tiempo máximo de 250 milisegundos (mseg). A partir de los gráficos se determinó que la máxima excitación ocurre a 441 nm. Similares experimentos se realizaron con CR5-ECFP y CR1-F84H-ECFP determinándose que también la máxima excitación ocurre a 441 nm.

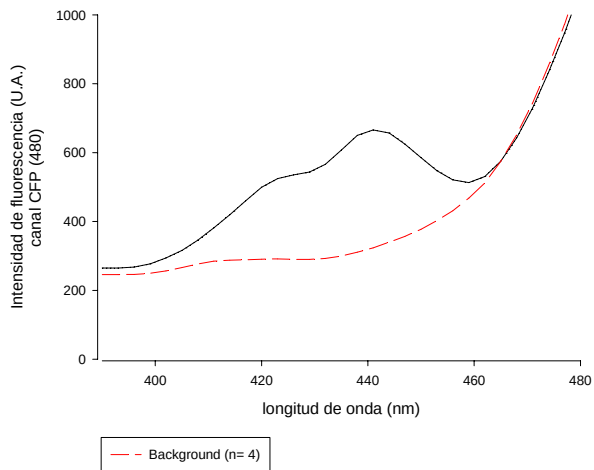
Espectro de excitación de SPAK-YFP



Background descontado



Espectro de Excitación CR1-CFP



Background descontado

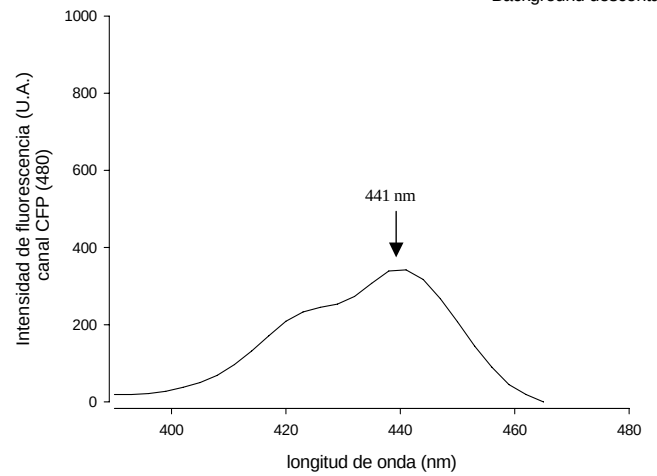


Figura 22. Espectro de excitación de las construcciones EYFP-SPAK y CR1-ECFP.

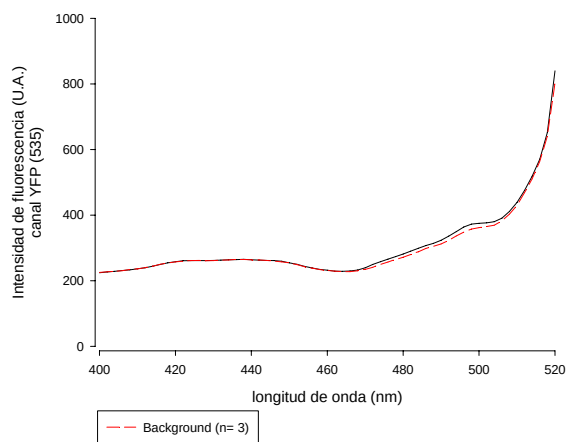
Paneles superiores. Las células HEK-293 fueron transfectadas en forma aguda con el plasmidio pEYFP-C1-rSPAK y se analizaron 24 horas post transfección. En cada experimento se evaluaron 3 regiones de interés (ROI), más 1 ROI para medir la señal de fondo (*background*). Las imágenes se obtuvieron usando un ancho de banda ± 8 , con un tiempo de excitación de 250 mseg. **A la izquierda** se muestra un gráfico que representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. **A la derecha** se muestra un gráfico que representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm) menos el *background*. La flecha indica el máximo de excitación a 502 nm (n= 3).

Paneles inferiores. Las células HEK-293 son transfectada en forma transitoria con el plasmidio pECFP-CR1 y se analizaron pasada 24 horas post transfección. En cada experimento se evaluaron 4 ROIs, más 1 ROI para medir la señal de fondo (*background*). Las imágenes se obtuvieron usando un ancho de banda ± 8 , con un tiempo de excitación de 250 mseg. **A la izquierda** se representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. **A la derecha** se representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm) menos el *background*. La flecha indica el máximo de excitación a 441 nm (n= 9).

Previo a montar la técnica de FRET se realizaron una serie de controles con el fin de obtener las mejores condiciones experimentales. En primera instancia se evaluó la autofluorescencia de la línea celular HEK-293, para lo cual se sembraron células en cubreobjetos de 25 mm de diámetro y se procedió a la adquisición de los espectros de excitación, bajo las mismas condiciones aplicadas en la obtención de los espectros de excitación tanto de la proteína fusionada a EYFP, como de la proteína fusionada a ECFP. El propósito de este ensayo era determinar que la máxima intensidad de fluorescencia de las células HEK-293 no fuera mayor a la obtenida con las proteínas fusionadas a las proteínas fluorescentes, debido a que eventualmente podría generar falsos positivos.

Como se aprecia en la figura 23 (panel inferior izquierdo) el espectro de excitación para las células HEK-293 en el canal EYFP (535), muestra un máximo de intensidad de fluorescencia de 9,6 U.A. Sin embargo este máximo de fluorescencia no se presenta a la máxima longitud de onda de excitación obtenida para la proteína de fusión a EYFP, el máximo se desplazó a una longitud de onda de 490 nm. Es de destacar que la señal de intensidad fluorescencia es prácticamente igual a la señal de fluorescencia generada por el *background*, en todo el rango de longitudes de onda evaluada, de 400 nm a 601 nm, razón por la cual no generaría una interferencia al momento de evaluar FRET, dado que la señal que pueda emitir la autofluorescencia de las células HEK-293 sería eliminada al restar el *background*. En el caso de los espectros de excitación de las células HEK-293 obtenidos en el canal ECFP (480), se aprecian las mismas características encontradas en los espectros de canal EYFP para la línea celular (panel inferior derecho de la Figura 23). La máxima señal de intensidad de fluorescencia (5,4 U.A.) se ha desplazado a un máximo de longitud de onda de 454 nm, siendo similar a la señal de

Espectro de excitación HEK-293



Espectro de excitacion HEK-293

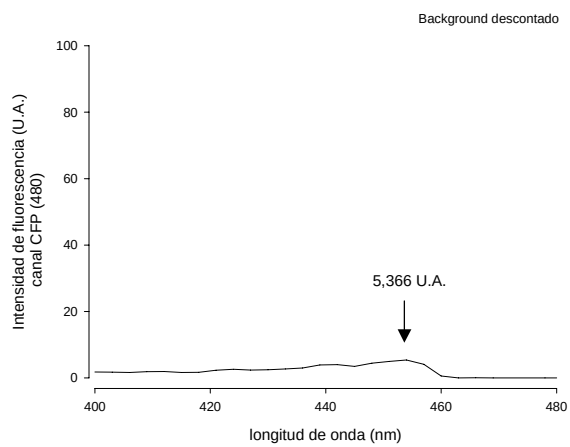
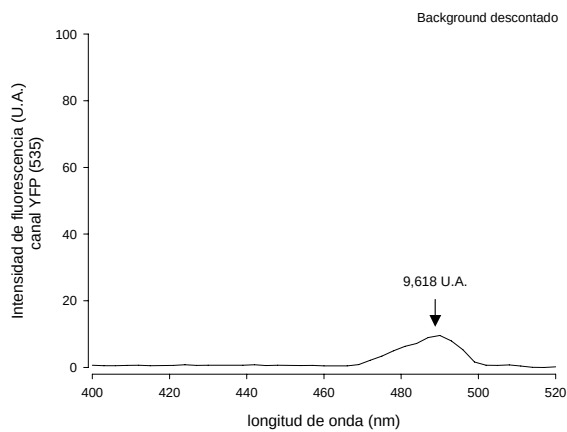
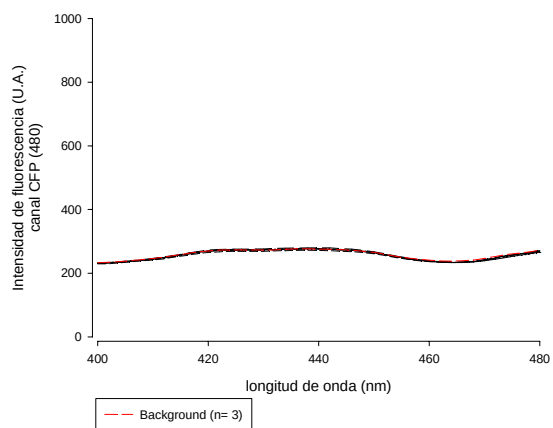


Figura 23. Espectro de excitación de HEK-293 en el canal YFP (535) y en el canal CFP (480). En cada experimento se evaluaron 3 ROIs, más 1 ROI para medir la señal de fondo (*background*). Las imágenes se obtuvieron usando un ancho de banda ± 8 , con un tiempo de excitación de 250 mseg. **Panel derecha superior:** se representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. La intensidad de fluorescencia se midió cada 3 nm, partiendo de 400 nm a 601 nm. **Panel derecha inferior:** se representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm) con el *background* restado. La flecha indica la máxima intensidad de fluorescencia (9,6 U.A.) a una longitud de onda de 490 nm ($n= 3$). **Panel izquierda superior se** representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. La intensidad de fluorescencia se midió cada 3 nm, partiendo de 390 nm a 531 nm. **Panel izquierda inferior se** ha descontado el *background*. La flecha indica la máxima intensidad de fluorescencia (5,4 U.A.) a una longitud de onda de 454 nm ($n= 3$).

fluorescencia generada por el *background*, durante todo el rango de longitudes de onda evaluada, de 390 nm a 531 nm. Este hecho da cuenta que la auto fluorescencia de la línea celular HEK-293 no crearía una interferencia en los resultados de FRET.

Otra condición importante de evaluar antes de realizar los ensayos de FRET, era determinar el porcentaje de contaminación provocado por la excitación de la proteína fluorescente amarilla (EYFP) a 440 nm. El espectro de excitación de EYFP presenta un máximo de excitación cercano a 450 nm, lo que implica que podría originar falsos positivos, debido a que la emisión de señal en el canal de YFP (535), no necesariamente podría estar correspondiendo a la transferencia de energía por parte del par de proteínas fluorescentes. Según se ha reportado (Wilson *et al.*, 2002) la excitación de EYFP a una longitud de onda de 458 nm genera una contaminación o “*bleed-through*”, por sobre un 30% de la señal inducida a 514 nm.

Una alternativa para evitar esta interferencia ocasionada por la excitación de EYFP, es expresar en mayor cantidad la construcción de la proteína fusionada a EYFP, con respecto a la proteína fusionada a ECFP (Wilson *et al.*, 2002), de tal forma de minimizar el grado de interferencia. Sin embargo es difícil ajustar la concentración relativa de ambas proteínas quiméricas, cuando ambas proteínas fluorescentes no forman parte de una misma construcción, como los denominados camaleones (Lakowicz, 1999).

Debido a lo antes señalado, se realizaron transfecciones con el plasmidio pEYFP-SPAK en células HEK-293 sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Pasado 24 horas post transfección se procedió a la adquisición de imágenes variando las condiciones de tiempo de exposición y ancho de banda (*bandwidth*).

Las células fueron excitadas a dos longitudes de onda, a 440 nm y a 500 nm, manteniendo los ROIs, región de interés, posicionados en forma exacta sobre las células. Cada imagen

capturada en el canal de YFP (535) se obtuvo en condiciones de tiempo de exposición de 500, 1000, 2000 y 3000 milisegundos, con un ancho de banda de +/-8 y a tiempos de exposición de 2000 y 3000 milisegundos con un ancho de banda de +/-4. La condición de ancho de banda de +/-4 no se consiguió obtener a tiempos menores de 2000 milisegundos, ya que no se observaba señal de fluorescencia.

En la figura 24 se observa un grafico comparativo de la intensidad de fluorescencia obtenida bajo las distintas condiciones evaluadas. Se destaca la gran diferencia de la intensidad de fluorescencia emitida excitando a 500 nm, con respecto a la excitación a 440 nm, la que es más evidente a mayor tiempo de exposición y ancho de banda.

De acuerdo a lo observado, el *bleed-through* o contaminación generada por la excitación de EYFP a 440 nm sería despreciable, dado que está por debajo de la señal de fondo, *background* obtenida por la excitación de EYFP a 500 nm.

Finalmente se determinó el porcentaje de contaminación de la señal de fluorescencia emitida excitando a 440 nm con respecto al total de fluorescencia obtenida excitando a 500 nm. Para lo cual se evaluaron las condiciones anteriormente descritas considerando dos tipos de expresión, alta y baja expresión, lo cual se determinó por el grado de iluminación de las células.

El cálculo se realizó restándole el *background* a las intensidades de fluorescencia obtenidas excitando tanto a 440 nm como a 500 nm, y se sacó un promedio para cada longitud de onda en cuestión. Seguidamente se calculó el porcentaje de *bleed-through* o contaminación para cada condición evaluada en alta y baja expresión, a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ bleed-through} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia (440)}}{\text{Intensidad de fluorescencia (500)}} \times 100\%$$

Intensidad de fluorescencia (500)

En la tabla 4 se aprecia que tanto en alta como en baja expresión, una condición de menor ancho de banda favorece la disminución del porcentaje de *bleed-through* o contaminación, a pesar de los altos tiempos de exposición, como son 2000 y 3000 milisegundos.

Una vez realizados los controles necesarios para evitar posibles falsos positivos, se realizó un ensayo de FRET, para lo cual se cotransfectaron los plásmidos pECFP-CR1 y pEYFP-SPAK en células HEK-293 sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Transcurrido 24 horas post transfección se procedió a la adquisición de espectros de excitación.

Los espectros de excitación se realizaron considerando un intervalo de longitudes de onda de excitación entre 400 nm a 601 nm, distanciadas cada 3 nm. La exposición a cada longitud de onda se realiza por un máximo de 2000 milisegundos, con un ancho de banda de ± 4 .

Como se observa en la figura 25 A y B, la excitación a una longitud de onda de 442 nm en el canal de YFP (535) permite determinar un máximo de intensidad de fluorescencia de 480 U.A., lo cual correspondería a la señal de FRET, producto de la interacción entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK, lo cual genera el acercamiento de las proteínas fluorescentes que están conformando ambas quimeras y por consiguiente la transferencia de energía desde ECFP a EYFP, motivo por el cual una excitación a 440 nm provoca la emisión de fluorescencia a 535 nm. Por otro lado se puede observar un máximo de intensidad de fluorescencia de 1170 U.A. correspondiente a la excitación directa de EYFP a una longitud de onda de 502 nm.

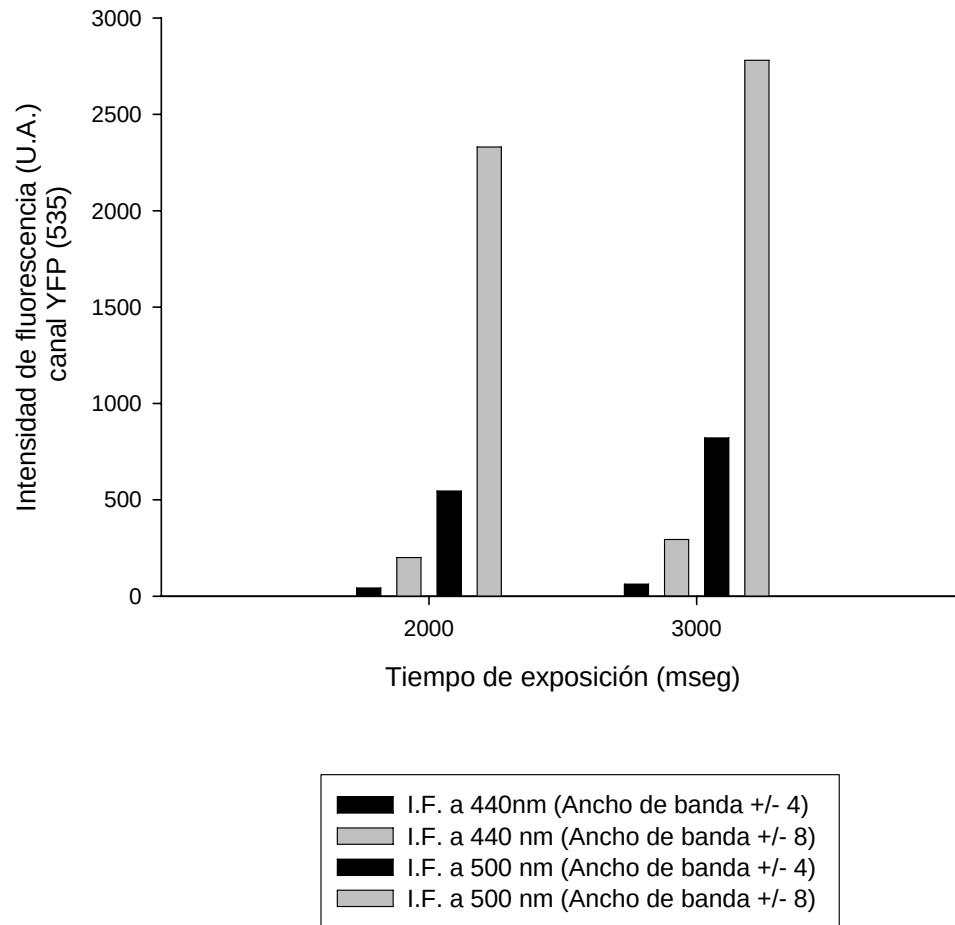


Figura 24. Intensidad de fluorescencia en función del Tiempo de exposición. El grafico representa la intensidad de fluorescencia (I.F.) en unidades arbitrarias versus los tiempos de exposición en milisegundos, a una condición de ancho de banda de +/-8 y +/-4; obtenidos en el canal YFP (535) excitando a las longitudes de onda de 440 nm y 500 nm. Intensidades de fluorescencia con el background descontado.

Tiempo de exposición (mseg)	Ancho de banda	Alta expresión Intensidad de fluorescencia	Baja expresión Intensidad de fluorescencia
500	(+/- 8)	7,251 %	7,856 %
1000	(+/- 8)	10,129 %	9,935 %
2000	(+/- 8)	11,178 %	9,816 %
3000	(+/- 8)	11,710 %	9,466 %
2000	(+/- 4)	6,345 %	8,307 %
3000	(+/- 4)	5,698 %	8,512 %

Tabla 4. Porcentaje de contaminación cruzada o *bleed-through* de EYFP-SPAK. Bajo cada nivel de expresión se indica la intensidad de fluorescencia promedio correspondiente al 100%. Alta expresión 1018,4 (U.A.) y baja expresión 137,8 (U.A.).

En la figura 26 C y D se aprecia la excitación de la proteína fluorescente ciano a una longitud de onda de 442 nm en el canal de CFP (480), lo cual correspondería a la energía no transferida por ECFP a EYFP.

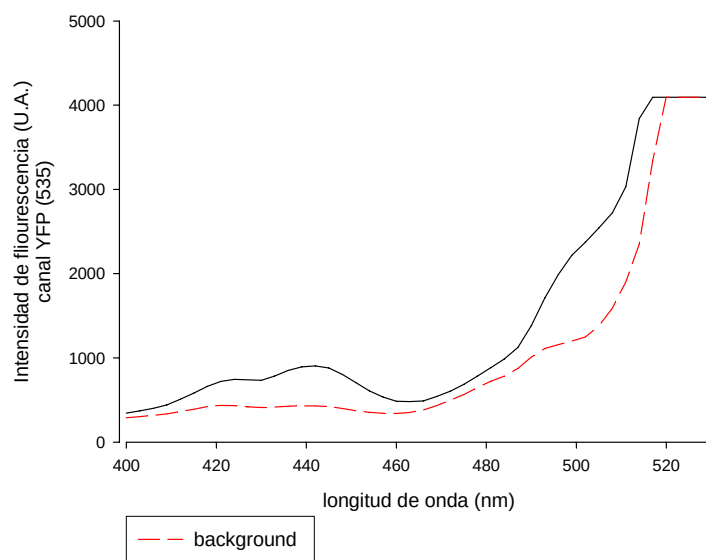
Una determinación cuantitativa de FRET a partir de los espectro de excitación adquiridos tanto en el canal de YFP como de CFP, correspondería al calculo del porcentaje de FRET. Para este propósito consideramos como 100% el total de la señal de fluorescencia de ECFP, tanto la emisión de fluorescencia de FRET obtenida en el canal de YFP (535) como la emisión de fluorescencia directa de ECFP, sin transferencia de energía, en el canal de CFP (480) y se determina el tanto por ciento de la señal de FRET, a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FRET} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia del aceptor} \times 100\%}{\text{Intensidad de fluorescencia del aceptor} + \text{donador}}$$

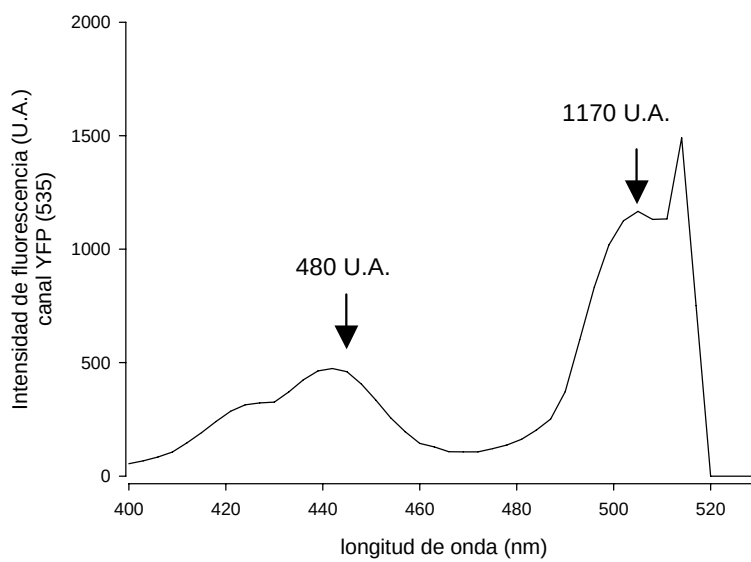
De acuerdo a los valores obtenidos de los espectros de excitación promedio, se calculó un porcentaje de FRET de $43\% \pm 0.95$. Si consideramos que el 100 % corresponde a una tranferencia de energía máxima, el valor obtenido para el par de proteínas CR1-SPAK daría cuenta de la existencia de una interacción proteína-proteína.

A

Espectro de excitación SPAK-YFP CR1-CFP

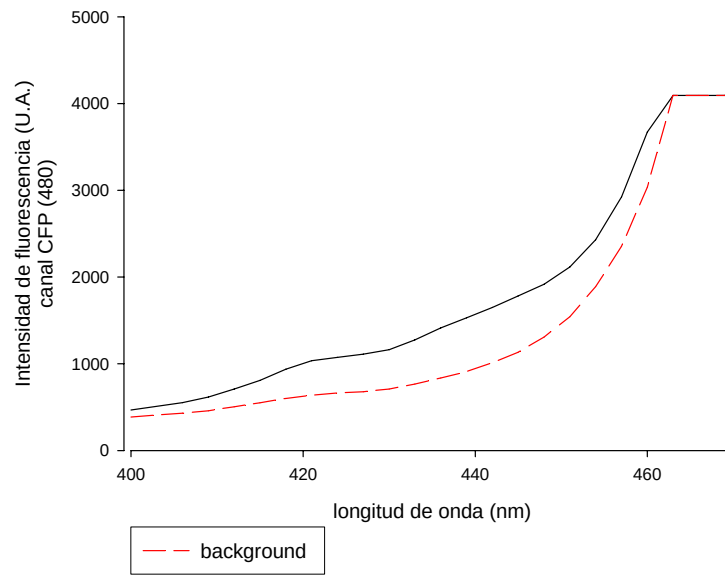
**B**

Background descontado



C

Espectro de excitación SPAK-YFP CR1-CFP

**D**

Background descontado

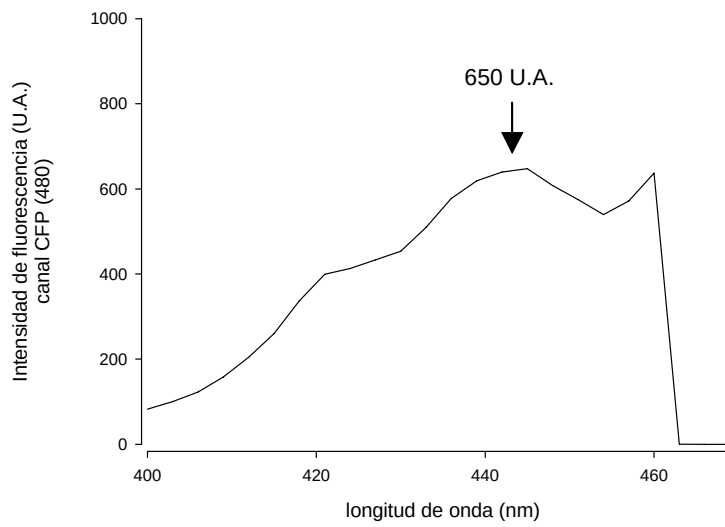


Figura 25. Espectros de excitación de EYFP-SPAK/ CR1-ECFP en el canal YFP y CFP. Las células HEK-293 son transfectadas en forma aguda con los pares pEYFP-SPAK y pECFP-CR1, y se analizaron pasada 24 horas post transfección. En cada experimento se evaluaron 3 ROI, más 1 ROI para medir la señal de fondo (*background*). Las espectros se obtuvieron usando un ancho de banda +/-4, con un tiempo de excitación de 2000 mseg. **A)** y **C)** gráfico representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. **B)** y **D)** gráfico representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm) con el *background* restado. La flecha indica el máximo de intensidad de fluorescencia (U.A.)(n= 14).

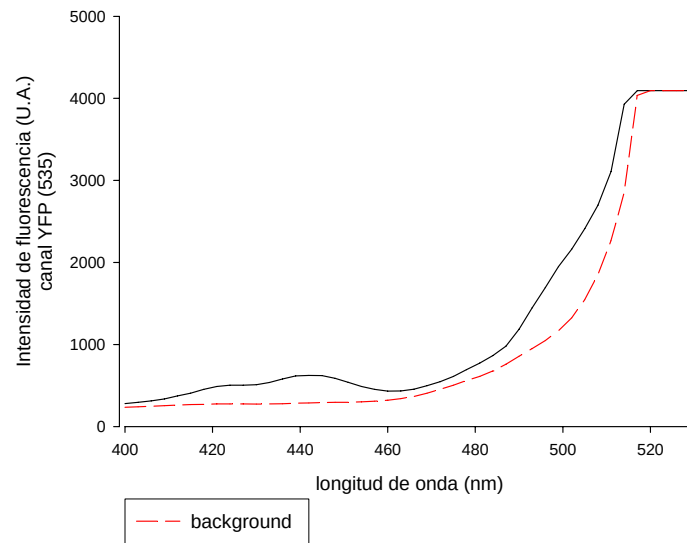
Una vez evaluado el comportamiento del par de proteínas CR1 y SPAK *in vivo*, se evalúa el comportamiento de CR5 frente a SPAK, para lo cual se cotransfectan los plasmidios pECFP-CR5 y pEYFP-SPAK en células HEK-293 sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Transcurrido 24 horas post transfección se procede a la adquisición de espectros de excitación, los cuales se evaluaron bajo las más mismas condiciones utilizadas para el par CR1-SPAK.

Como se observa en la figura 26 A y B, la excitación a una longitud de onda de 442 nm en el canal de YFP (535) permite determinar un máximo de intensidad de fluorescencia de 335 U.A., lo cual correspondería a la señal de FRET. Por otro lado se puede observar un máximo de intensidad de fluorescencia de 868 U.A. correspondiente a la excitación directa de EYFP a una longitud de onda de 502 nm. En la figura 26 C y D se aprecia la excitación de la proteína fluorescente ciano a una longitud de onda de 442 nm en el canal de CFP (480), lo cual correspondería a la energía no transferida por ECFP a EYFP.

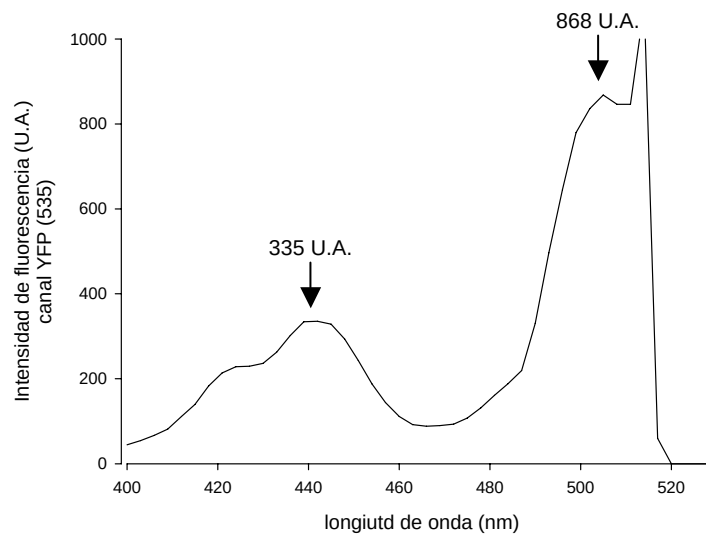
Es de destacar que el porcentaje de FRET obtenido para el par de proteínas CR5-ECFP e EYFP-SPAK (% FRET $37\% \pm 0.23$), es cercano al porcentaje de FRET obtenido para el juego de proteínas CR1-CFP e EYFP-SPAK, indicando una posible interacción entre CR5 y SPAK. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos bajo un sistema *in vitro*, co-inmunoprecipitación.

A

Espectro de excitación SPAK-YFP/ CR5-CFP

**B**

Background descontado



C

Espectro de excitacion SPAK-YFP/ CR5-CFP

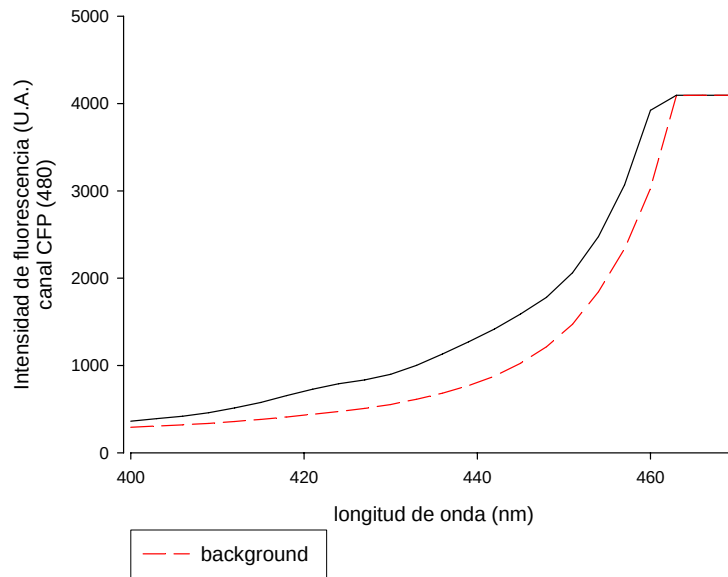
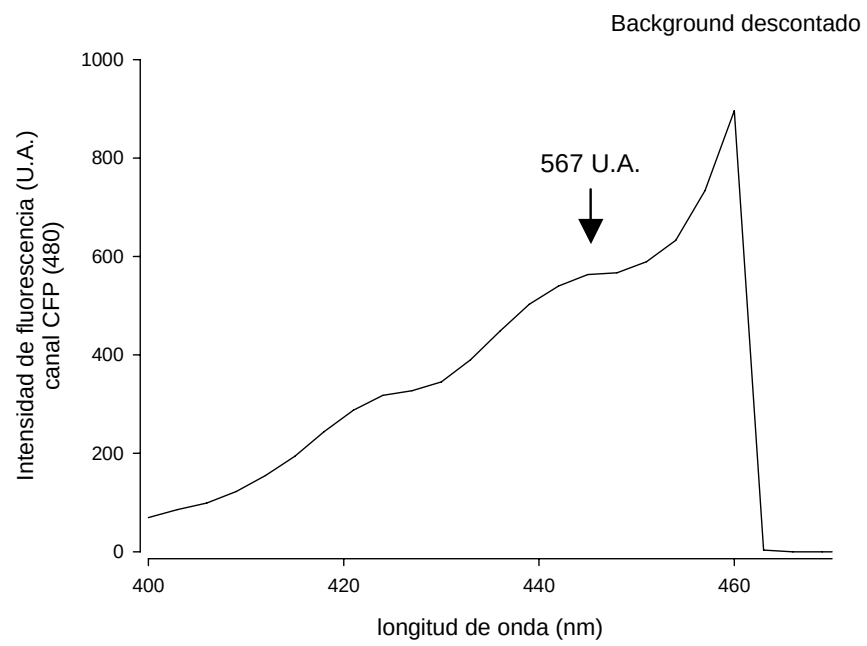
**D**

Figura 26. Espectros de excitación de EYFP-SPAK/ CR5-ECFP en el canal YFP y CFP. Las células HEK-293 son transfectadas en forma transiente con los plasmidios pEYFP-SPAK y pECFP-CR1 y se analizaron pasada 24 horas post transfección. En cada experimento se evaluaron 3 ROI, más 1 ROI para medir la señal de fondo (*background*). Los espectros se obtuvieron usando un ancho de banda ± 4 , con un tiempo de excitación de 2000 mseg. **A)** y **C)** gráfico representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm), la línea roja indica el *background*. **B)** y **D)** gráfico representa la intensidad de fluorescencia (U.A.) versus la longitud de onda (nm) con el *background* restado. La flecha indica el máximo de intensidad de fluorescencia (U.A.)(n= 15).

4.6. PLANTEAMIENTO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA

Con la idea de probar un sistema de co-inmunoprecipitación alternativo al utilizado en las construcciones con la proteína fluorescente verde (EGFP) y para corroborar los resultados obtenidos anteriormente se decidió retomar una estrategia pensada previamente. Esta consistió en la construcción del canal y sus variantes fusionada al epítipo V5 para ser usado como control ya que la proteína de interés fusionada a una proteína tan grande como EGFP podría generar un impedimento estérico bloqueando la interacción proteína-proteína o favoreciendo una interacción artefactual.

4.6.1. Generación de proteínas CR1, CR5 y CR1-F84H etiquetadas con el epítipo V5

Con la finalidad de realizar los experimentos de co-inmunoprecipitación se generaron proteínas fusionadas al epítipo V5. Para obtener la secuencia codificante de CR1, fusionada al epítipo V5, se realizó una reacción de PCR, en la cual se incorporó un sitio de restricción *Xba I*, eliminando el codón de término, el cual permitirá clonar del producto de PCR en el vector de expresión. El producto de PCR de 1061 pb se visualizó realizando una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 1,0 % (figura 27A). El fragmento purificado de PCR se subclonó en el vector pGEM T Easy. Con el plasmidio resultante se transformaron bacterias competentes Dam⁻. Posteriormente el vector se purificó y se digirió con las enzimas *Cla I* y *Xba I*. (figura 27B). Este fragmento de 338 pb se ligó con el resto de la secuencia codificante de CR1, proveniente del plasmidio pEGFP-N1-CR1 y previamente digerido con las enzimas *Hind III* y

Cla I, para reconstituir la secuencia de la proteína, y conjuntamente se ligaron al vector pcDNA3-V5, previamente digerido con las enzimas *Hind III* y *Xba I* (figura 27C), generándose de esta forma la construcción pcDNA3-V5-CR1.

El plasmidio pEGFP-N1-CR1 fue sometido a sucesivas digestiones enzimáticas hasta obtener el fragmento de interés. En primer lugar se digirió con la enzima *Xba I* para linearizar el vector (figura 28A) y posteriormente se realizó una doble digestión con las enzimas *Cla I* y *Hind III*, sitios de restricción que permitieron reconstituir la secuencia de la proteína e insertarlo en el vector de expresión. Producto de la doble digestión enzimática se obtuvieron dos fragmentos de DNA de tamaños muy cercanos (figura 28B), por lo cual se procedió a cortar ambas bandas del gel y se extrajo el DNA para luego realizar una digestión simple que separó al fragmento de DNA de interés. Para tal propósito se utilizó la enzima *Bst BI* que permitía obtener el fragmento de interés de 2562 pb y dos fragmento de DNA de menor tamaño, 1845 pb y 842 pb (figura 28C).

A partir del plasmidio pcDNA3-V5-CR1, se generaron los plasmidios pcDNA3-V5-CR5 y pcDNA3-V5-CR1-F84H. Los vectores pEGFP-N1-CR5, pEGFP-N1-CR1-F84H y pcDNA3-V5-CR1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bpu1102 I*, obteniéndose los fragmentos de DNA de 7660 pb y menores 500 pb. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa, y se extrajeron las bandas correspondientes al vector y los insertos (figura 29 A y B). La ligación de estos fragmentos generó dos vectores de aproximadamente 8200 pares de bases que contenía el cDNA de CR1 con la variante de empalme y la mutación puntual, fusionado al epítipo V5. Los plasmidios se purificaron y se les practicó un ensayo de restricción con la enzima *Sac II*, obteniéndose los fragmentos esperados de 5500 pb y aproximadamente 2700 pb (figura 29C).

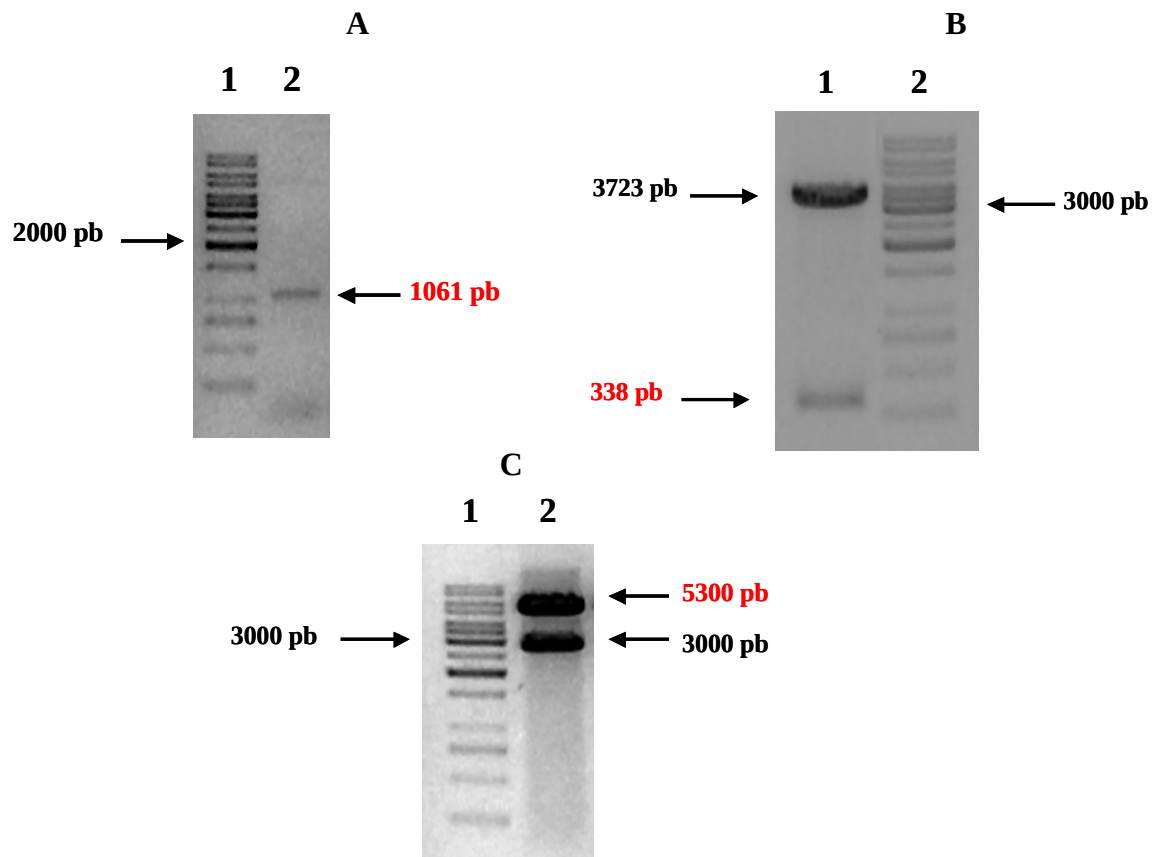


Figura 27. Separación electroforética del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción del vector pcDNA3-V5-hCIC-2. **A)** Se observa el producto de PCR de 1061 pb, obtenido con los partidores CFOR4 y CRstopXbaIrev, y pCR3.1-CR1 como templado. **B)** Se observa el plasmidio pGEM T Easy más el producto de PCR digerido con las enzimas de restricción *Cla I* y *Xba I*. **C)** Se observa el plasmidio pcDNA3-V5-hCIC-2 digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xba I*, obteniéndose los fragmentos esperados de 5300 pb y 3000 pb. Los carriles 1 en A, 2 en B y 1 en C, corresponden al estándar de peso molecular 1Kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

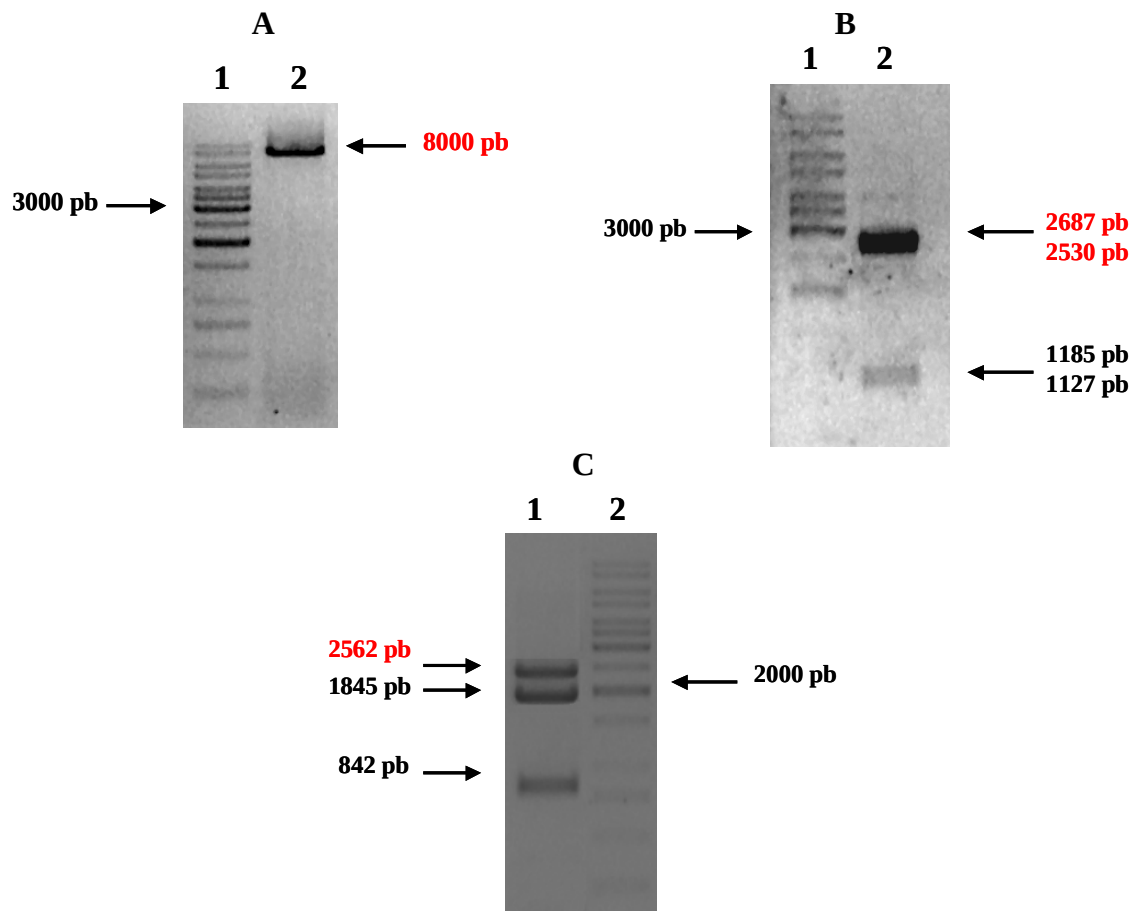


Figura 28. Digestión con enzimas de restricción del vector pEGFP-N1-CR1. **A)** Se observa la linearización del plasmidio pEGFP-N1-CR1 producto de la digestión enzimática con *Xba I*. **B)** Se observa el plasmidio pEGFP-N1-CR1 digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *Cla I*, obteniéndose fragmentos de similar tamaño. **C)** Se observa la digestión enzimática del vector pEGFP-N1-CR1 con la enzima *Bst BI*. Los carriles 1 en A, 1 en B y 2 en C corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

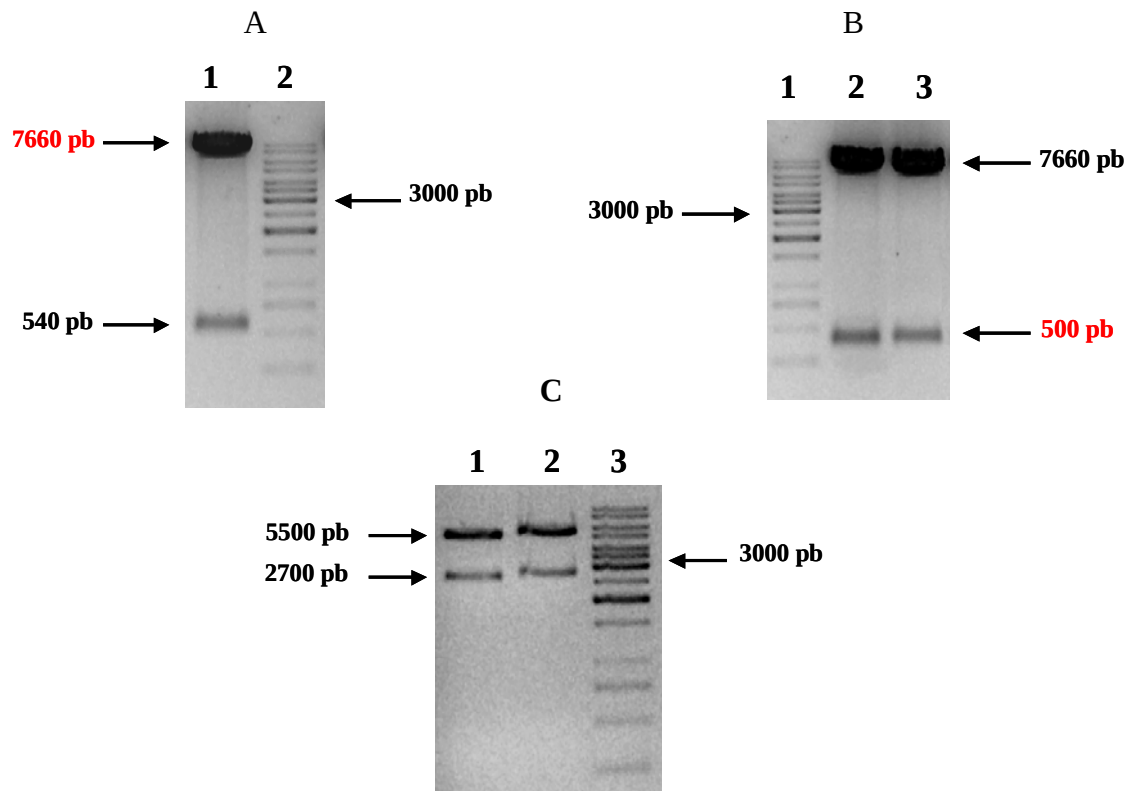


Figura 29. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pEGFP-N1-CR5, pEGFP-N1-CR1-F84H y pcDNA3.1-V5-CR1. A) Se observa el plasmidio pEGFP-N1-CR1 digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bpu1102 I*, obteniéndose los fragmentos esperados de 7660 pb y 540 pb. B) Se observa en el carril 2: el vector pEGFP-N1-CR5 y en el carril 3: el vector pEGFP-N1-CR1-F84H, digeridos con las enzimas *Hind III* y *Bpu1102 I*, obteniéndose los fragmentos esperados de 7660 pb y aproximadamente 500 pb. C) Se observa la digestión enzimática de los plasmidios pcDNA3.1-V5-CR5 y pcDNA3.1-V5-CR1-F84H realizados con la enzima *Sac II*, obteniéndose dos fragmentos de 5500 pb y aproximadamente 2700 pb. Los carriles 2 en A, 1 en B y 3 en C, corresponden al estándar de peso molecular 1kb (Fermentas). Las separaciones de los fragmentos se realizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

Previo a los ensayos de co-inmunoprecipitación se evaluó la expresión de estos plasmidios en células HEK-293, para lo cual se realizaron experimentos de inmunolocalización de la proteína CR-1, CR5 y CR1-F84H etiquetadas con el epítipo V5.

Las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro, en las mismas condiciones que las utilizadas para los experimentos de transfecciones transitorias descritos anteriormente. Se transfectaron en plasmidios pcDNA3.1-V5-CR1, pcDNA3.1-V5-CR5 y pcDNA3.1-V5-CR1-F84H. Transcurridas 24 horas post transfección se realizó la inmunolocalización de las proteínas CR1-V5, CR5-V5 y CR1-F84H-V5, utilizando como anticuerpo primario anti-V5 de ratón y como anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 y fueron observadas mediante microscopia de fluorescencia. En las imágenes se observa que la proteínas tienen una localización de membrana en grumos (figura 30), comparable con las imágenes observadas de las proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde (EGFP) (figura 12).

El siguiente paso fue analizar las proteínas totales de la línea celular HEK-293 transfectada transitoriamente con los plasmidios pcDNA3.1-V5-CR1, pcDNA3.1-V5-CR5 y pcDNA3.1-V5-CR1-F84H. Una vez separadas las proteínas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para luego ser incubadas con el anticuerpo primario anti-V5 monoclonal de ratón. A continuación se incubaron con el segundo anticuerpo, IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP), para posteriormente ser detectadas mediante el método de quimioluminiscencia. Como se puede apreciar en la figura 31 el anticuerpo es específico para el epítipo V5, descartándose reacciones cruzadas con proteínas inespecíficas.

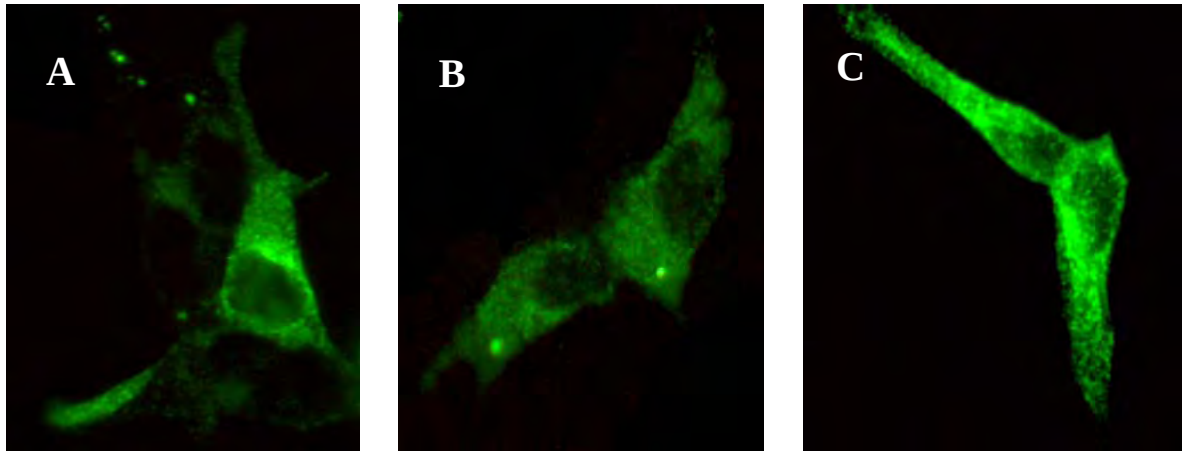


Figura 30. Localización celular de CR1-V5, CR5-V5 y CR1-F84H-V5 en la línea celular HEK-293. Las células se cultivaron en cubre objetos y se transfectaron con pcDNA3.1-V5-CR1, pcDNA3.1-V5-CR5 y pcDNA3.1-V5-CR1-F84H, y fueron analizadas 24 horas post transfección, mediante microscopía fluorescencia. Se puede observar la localización de membrana, no uniforme y grumosa en **A)** CR1-V5 (n= 3), **B)** CR5-V5 (n= 3) y **C)** CR1-F84H-V5 (n= 3).

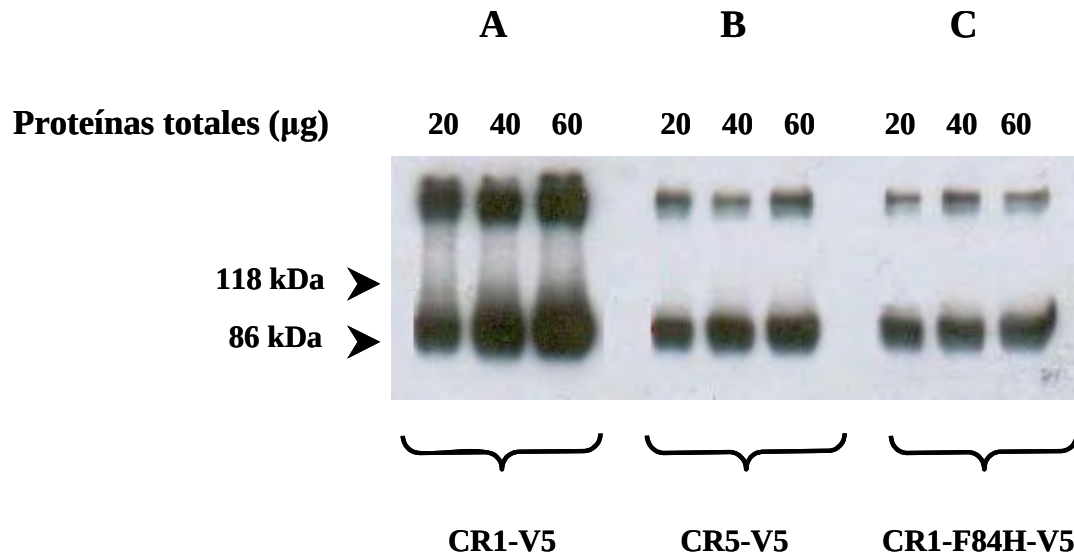


Figura 31. Análisis de Western blots de CR1-V5, CR5-V5 y CR1-F84H-V5. Células HEK-293 fueron transfectadas transitoriamente con los plasmidios pcDNA3.1-V5-CR1, pcDNA3.1-V5-CR5 y pcDNA3.1-V5-CR1-F84H. Concentraciones crecientes de proteínas totales fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE. El anticuerpo anti-V5 reconoce una banda de ~95 kDa para CR1, CR5 y CR1-F84H. **A)** líneas 1-3: CR1-V5; **B)** línea 4-6: CR5-V5 y **C)** línea 7-9: CR1-F84H-V5. Las puntas de flecha indican marcador de proteínas.

Una vez evaluada la expresión de las construcciones, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación para determinar la posible interacción entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK. Se cotransfectaron células HEK-293 con los siguientes pares de plásmidos: pCR3.1-rSPAK-HA y pcDNA3.1-V5-CR1, pCR3.1-rSPAK-HA y pcDNA3.1-V5-CR5. La inmunoprecipitación se realizó precipitando con la proteína G PLUS-agarosa y el anticuerpo anti-V5 monoclonal, mientras que el Western blot se realizó detectando a la proteína SPAK, con el anticuerpo primario anti-HA (3F10) monoclonal y como anticuerpo secundario IgG anti-rata marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

Como se puede observar en la figura 32, no se logró co-inmunoprecipitar el canal CR1 con la proteína quinasa SPAK, tampoco co-inmunoprecipitó con la variante de empalme, CR5, en comparación con lo que se obtuvo con la co-inmunoprecipitación obtenida de las construcciones con EGFP (figura 20). Sin embargo se aprecia mucho *background* y las bandas inespecíficas. No obstante, es posible mejorar las condiciones del protocolo y con ello contribuir a la visualización de una posible banda correspondiente al inmunoprecipitado.

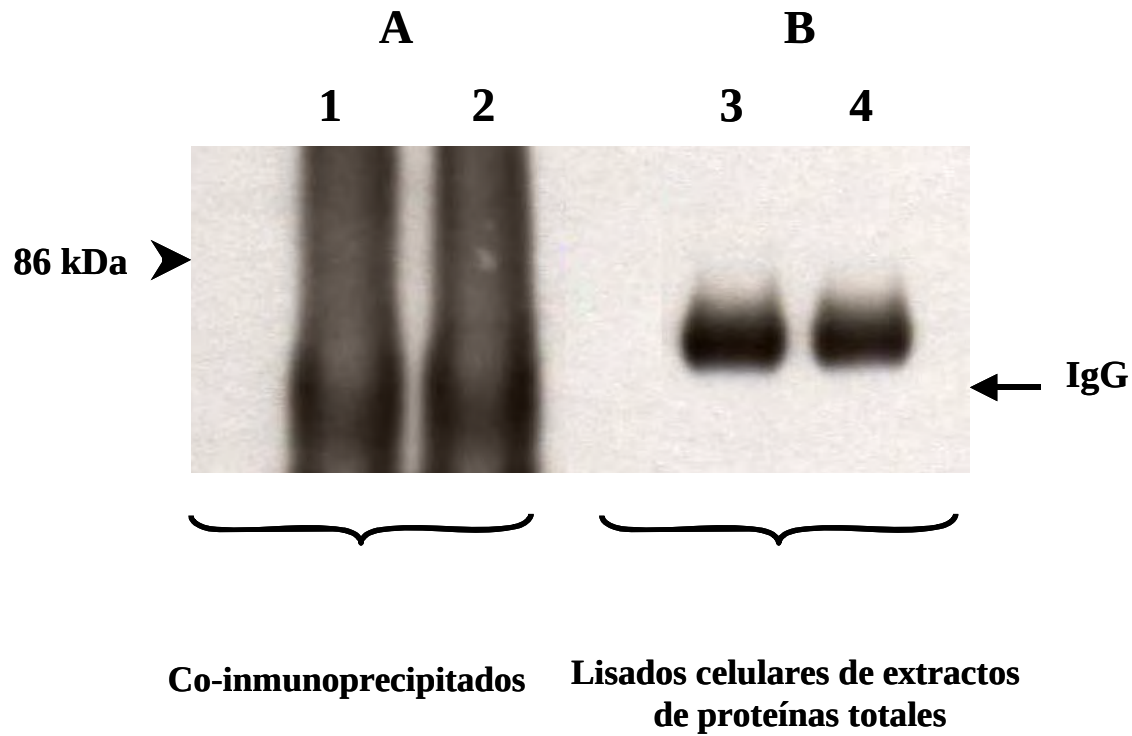


Figura 32. Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de CR1-V5 y CR5-V5. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plasmidios: pCR3.1-rSPAK-HA y pcDNA3.1-V5-CR1, pCR3.1-rSPAK-HA y pcDNA3.1-V5-CR5. Para co-inmunoprecipitar se utilizó el anticuerpo anti-V5 monoclonal de ratón y la proteína G PLUS-agarosa. El Western blot se realizó utilizando como anticuerpo primario anti-HA (3F10) monoclonal y como anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con HRP. El anticuerpo anti-HA reconoce una banda de ~60 kDa para SPAK. **A)** experimentos de co-inmunoprecipitación y **B)** lisados celulares de extractos de proteínas totales. Línea 1: experimento a de co-inmunoprecipitación de CR1-V5 y SPAK-HA; línea 2: experimento b de co-inmunoprecipitación de CR5-V5 y SPAK-HA; líneas 4-5: lisado de extractos de proteínas totales de los experimentos a y b (n= 3). Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

5. DISCUSIÓN

Casi todo lo que sucede en la célula requiere de la intervención de una o más proteínas. Su papel central en la célula queda reflejado en el hecho de que la información genética se expresa en último término en forma de proteínas (Nelson & Cox, 2005). En una célula típica existen miles de proteínas diferentes, cada una codificada por un gen y encargada de realizar una tarea específica (Pawson & Nash, 2000). Las interacciones proteína-proteína han pasado a ser una parte esencial para comprender la función de cada proteína (Fu, 2004).

El uso eficiente de los datos sobre la interacción entre proteínas requiere de una evaluación crítica de su exactitud, redundancia (cuando se describe la interacción entre un par específico de proteínas, utilizando iguales condiciones experimentales) y complementariedad (cuando se describe la interacción entre un par específico de proteínas, por varios métodos con enfoques diferentes o por un solo método utilizando diferentes condiciones experimentales) (Pons *et al.*, 2003). Desafortunadamente, la correspondencia entre un conjunto amplio de análisis de interacciones proteína-proteína, sólo se ha investigado recientemente (von Mering *et al.*, 2002). Una posible explicación a la escasa correlación de la información, es que la comparación de los datos experimentales es difícil pues se obtienen en diferentes condiciones y poseen diferentes formatos. Es importante notar, además, que las proteínas interactúan entre ellas con un amplio intervalo de afinidades y escalas de tiempo. Algunas interacciones fisiológicas son transitorias y débiles, por consecuencia, la detección de dichas interacciones está frecuentemente en el margen de error de la observación (Ito *et al.*, 2001; Rain *et al.*, 2001).

Para aumentar el nivel de confianza en las interacciones detectadas experimentalmente, y documentadas en diferentes publicaciones, se debe observar la misma interacción por diferentes métodos (Schwikowski *et al.*, 2000).

La combinación del mayor número posible de datos experimentales y teóricos, sobre interacciones entre proteínas, proporcionará información más completa y detallada de los sistemas biológicos. De aquí se desprende la importancia y el enorme esfuerzo para desarrollar métodos experimentales y teóricos más precisos para el estudio de las interacciones entre proteínas.

En este sentido el descubrimiento de las proteínas fluorescentes ha permitido revolucionar la biología celular al acceder a datos sobre localización, dinámica y redes de interacción molecular de numerosas proteínas con una gran resolución temporal y espacial (Tsien, 1998). El uso más extendido de las proteínas fluorescentes es como proteínas marcadoras fusionadas a otra. En estos casos, se debe verificar que la fusión no afecte el plegamiento. Además, como indicador, la fluorescencia es también alterada postraduccionalmente por el ambiente químico o interacción proteína-proteína. Cuando se unen a iones, segundos mensajeros, o sufren modificaciones como fosforilación, proporcionan una señal fluorescente, que podría generar falsos positivos (Llopis *et al.*, 2005). Pero la manera más general de hacer un sensor bioquímico con una proteína fluorescente es explotar la capacidad de transferir la energía de resonancia de la fluorescencia (FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), entre dos proteínas de diferente color. FRET es un fenómeno mecánico cuántico que ocurre cuando dos fluoróforos están próximos ($<100 \text{ \AA}$ de distancia) y el espectro de emisión de uno, el dador, se superpone con el de excitación del segundo, el aceptor. Bajo estas condiciones, la excitación del dador produce la emisión del receptor a expensas del pasaje de energía. Sin embargo, como limitaciones de esta técnica *in vivo*

se destaca el hecho que las proteínas quiméricas deben mantener la función de las proteínas nativas, es decir, deben expresarse proteínas de fusión, donde ambas partes deben permanecer funcionales; para lo cual es necesario transferir cDNA (o mRNA) mediante transfección, transducción viral o microinyección y esperar a que se sinteticen las proteínas. Es difícil de ajustar la concentración relativa de ambas proteínas, que debería ser igual para una óptima detección de FRET (Lakowicz, 1999); por otro lado, el cociente señal/ruido está limitado por la mala separación espectral entre donador y aceptor (Selvin, 2000). Además, se requieren controles negativos de interacción; en este sentido, el mejor control negativo que se puede tener corresponde a la introducción de una mutación que impida la interacción entre las proteínas.

En la determinación de FRET intermolecular con frecuencia aparecen falsos negativos, probablemente porque la distancia entre las proteínas fluorescentes en el complejo de las proteínas que interaccionan es mayor a la que permite FRET (aproximadamente de 3 a 10 nm para donador/aceptor), o porque su orientación en el complejo es desfavorable (Vogel, 2006). También hay que considerar que la presencia de proteínas endógenas (no marcadas con proteínas fluorescentes) puede disminuir la sensibilidad del método, ya que en ese caso pueden formarse complejos de proteína marcada y no marcada, los cuales no producen señal FRET (Llopis, 2005).

Pese a todas estas reservas, FRET presenta ventajas frente a otras técnicas de detección de interacciones moleculares. Por ejemplo, la interacción puede estudiarse en el interior de cualquier célula y no está limitada al núcleo de la levadura, como ocurre con la técnica del doble híbrido (Llopis, 2005). Además responde dinámicamente a las modificaciones postraduccionales, posee alta resolución temporal (milisegundos) y espacial (submicrones) y el grado de disociación puede ser cuantificado, de 0% a 100% de unión, lo cual es determinado *in situ*. Cuando se demuestra

FRET intermolecular fehacientemente, la información obtenida supera en resolución temporal y espacial a la obtenida con cualquier otra técnica (Selvin, 2000).

El sistema de doble híbrido es una técnica *in vivo* creada para detectar interacción entre proteínas, la cual ha dado origen a una serie de tecnologías de segunda generación que promete expandir notoriamente su utilidad, como por ejemplo, el doble híbrido en células de mamíferos, el triple híbrido y el doble híbrido inverso (Coates & Hall, 2003). La principal limitación de esta técnica radica en que no permite analizar las interacciones entre proteínas localizadas en compartimentos diferentes de la célula, limitando por tanto su aplicación. Por otra parte, es habitual la presencia de falsos positivos provocados por la activación del gen indicador por parte de otras proteínas de la levadura, además de falsos negativos debido a problemas en la unión de las dos proteínas, debido a que no todas las proteínas son eficientemente plegadas y/o modificadas post traduccionalmente en el núcleo de las levaduras o porque las proteínas pueden adoptar una estructura terciaria diferente cuando se expresan fusionadas al domino de activación, con lo cual podría inhibir potencialmente la unión a la proteína de interés (Coates & Hall, 2003).

Debido a lo descrito anteriormente es necesario validar la posible interacción proteína-proteína resuelta por el sistema de doble híbrido. La confirmación se puede llevar a cabo por medio de técnicas *in vitro*. De esta forma se demuestra que las proteínas interaccionan directamente y que las interacciones no son producto, por ejemplo, del mal plegamiento causado por la presencia de los motivos fusionados (Coates & Hall, 2003).

Una técnica *in vitro* ampliamente utilizada, es expresar ambas proteínas en células por transfección y analizar las interacciones por estudio de co-inmunoprecipitación.

Tanto la técnica de co-inmunoprecipitación como la técnica de pull-down tienen como base la metodología de cromatografía de afinidad, permitiendo el estudio de posibles patrones de unión, caracterizados por una alta selectividad.

La técnica de pull-down permite purificar por afinidad de forma similar a la técnica de inmunoprecipitación, excepto que una proteína “cebo” es usada en lugar de un anticuerpo.

Con respecto al protocolo de co-inmunoprecipitación, se exhiben ciertas deficiencias relacionadas fundamentalmente con el formato del ensayo, los anticuerpos y la química asociada. Uno de los problemas más comúnmente encontrados es la reacción cruzada de los anticuerpos, al momento de analizar el Western blot. La presencia de bandas generadas por las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo primario (50 y 25 kDa respectivamente) utilizado para inmunoprecipitar, el cual es detectado por el anticuerpo secundario en el Western blot, podría enmascarar el resultado.

Los anticuerpos que se utilicen son también muy importantes. Un buen anticuerpo se refleja por la mínima o nula presencia de bandas inespecíficas, observándose un fondo (*background*) bajo cuando se analizan posteriormente a través de Western blot. El éxito de la inmunoprecipitación finalmente depende de la afinidad del anticuerpo con su antígeno. Los anticuerpos policlonales son complejos y más estables, presenta una alta intensidad de señal, pero presentan mayor unión inespecífica; sin embargo, esta problemática puede manejarse modificando el protocolo, ya sea realizando lavados más drásticos o adsorbiendo con sueros el anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales presentan mayor especificidad y menor unión inespecífica, la intensidad de señal es baja y su afinidad por la proteína A/G es variable, asimismo requieren de una alta afinidad por su antígeno, por lo cual se debe tener cuidado con los lavados.

Frente a los antecedentes descritos anteriormente y considerando los requerimientos de cada una de las técnicas estudiadas, se decidió emplear como técnica para la determinación de interacción de proteínas *in vitro*, la técnica de coimmunoprecipitación, dado que frente al ensayo de pull-down y doble híbrido, los plasmidios y anticuerpos que se requieren no son específicos, siendo de libre elección para el investigador. Además el uso de esta técnica se ha masificado a nivel de otros laboratorios cercanos, lo que permitió una interrelación de los conceptos y aplicaciones con otros investigadores al momento de montar esta técnica en nuestro laboratorio. Por otro lado se optó por determinar una interacción proteína-proteína a través del sistema *in vivo*, FRET (transferencia de energía resonante de fluorescencia), ya que dentro de nuestro laboratorio teníamos la infraestructura requerida para realizar dicho ensayo, dado por un microscopio de epifluorescencia equipado con una lámpara ARC Cairn y un monocromador Cairn Optoscan, y una cámara controladora de la luz de emisión. Además, en el laboratorio existían los plasmidios pECFP-N1 y pEYFP-N1, cuyos espectros de emisión y absorción, respectivamente se solapan y permiten realizar ensayos de FRET.

5.1. Interpretación de los resultados

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente bajo el sistema *in vitro* representado por el método de coimmunoprecipitación, como *in vivo*, por el método de FRET; se demostró que tanto el canal ClC-2 completo como la variante de empalme carente de la secuencia de unión a SPAK, estarían interaccionando con la proteína quinasa SPAK. Sin embargo, un análisis profundo de la interpretación de los resultados, nos llevó a examinar un punto crítico para

la realización de las contrucciones con la proteína fluorescente verde (EGFP) y sus variantes de colores, proteína fluorescente amarilla (EYFP) y la proteína fluorescente ciano (ECFP), el cual no se había tomado en cuenta al momento de ejecutar la estrategia, ni durante todo el desarrollo experimental. ¿La secuencia de la proteína EGFP posee un motivo de unión a SPAK? La respuesta se obtuvo a partir del análisis de la secuencia de la proteína, que como se observa en la figura 33, posee un sitio motivo de unión a SPAK dentro de los primeros cincuenta aminoácidos. Este descubrimiento explicaría la razón por la cual CR5, a pesar de no poseer un motivo de unión a SPAK también coimmunoprecipitaba y daba una señal de FRET tan intensa como con CR1.

En este punto quisiera hacer un paréntesis y referirme a dos de la publicaciones que fueron referente para este trabajo de tesis y en la cual sus autores demostraron la interacción de proteínas, entre la proteína quinasa SPAK y el canal NKCC1, trabajo publicado por Delpire *et al.*, 2005 y con el canal NCCT publicado por O`Shaughnessy *et al.*, 2006; en las cuales tienen la secuencia del canal fusionada a la proteína fluorescente verde (EGFP) y proteína fluorescente ciano (ECFP), respectivamente. Recordando lo descrito en un comienzo de este capítulo, se debe tener especial cuidado en la base de datos que se pueda formular a partir de las publicaciones de literatura científica, pues de manera general son la fuente para el desarrollo de métodos teóricos de trabajo. Por lo cual, podríamos concluir hasta este momento, que para aumentar el nivel de confianza en las interacciones detectadas experimentalmente, y documentadas en diferentes publicaciones, se debe observar la misma interacción por diferentes métodos.

Vale la pena mencionar que durante los distintos ensayos realizados para estandarizar el método de coimmunoprecipitación se utilizó como control negativo el canal Task2-EGFP, para lo cual se precipitó con el anticuerpo anti-HA y se detectó en el Western blot con el anticuerpo anti-

MSE	SER	LYS	GLY	GLU	GLU	LEU	PHE	THR	GLY
VAL	VAL	PRO	ILE	LEU	VAL	GLU	LEU	ASP	GLY
ASP	VAL	ASN	GLY	HIS	LYS	PHE	SER	VAL	SER
GLY	GLU	GLY	GLU	GLY	ASP	ALA	THR	TYR	GLY
LYS	LEU	THR	LEU	LYS	PHE	ILE	CYS	THR	THR
GLY	LYS	LEU	PRO	VAL	PRO	TRP	PRO	THR	LEU
VAL	THR	THR	PHE	<u>SER</u>	<u>TYR</u>	<u>GLY</u>	VAL	GLN	CYS
PHE	SER	ARG	TYR	PRO	ASP	HIS	MSE	LYS	ARG
HIS	ASP	PHE	PHE	LYS	SER	ALA	MSE	PRO	GLU
GLY	TYR	VAL	GLN	GLU	ARG	THR	ILE	PHE	PHE
LYS	ASP	ASP	GLY	ASN	TYR	LYS	THR	ARG	ALA
GLU	VAL	LYS	PHE	GLU	GLY	ASP	THR	LEU	VAL
ASN	ARG	ILE	GLU	LEU	LYS	GLY	ILE	ASP	PHE
LYS	GLU	ASP	GLY	ASN	ILE	LEU	GLY	HIS	LYS
LEU	GLU	TYR	ASN	TYR	ASN	SER	HIS	ASN	VAL
TYR	ILE	MSE	ALA	ASP	LYS	GLN	LYS	ASN	GLY
ILE	LYS	VAL	ASN	PHE	LYS	ILE	ARG	HIS	ASN
ILE	GLU	ASP	GLY	SER	VAL	GLN	LEU	ALA	ASP
HIS	TYR	GLN	GLN	ASN	THR	PRO	ILE	GLY	ASP
GLY	PRO	VAL	LEU	LEU	PRO	ASP	ASN	HIS	TYR
LEU	SER	THR	GLN	SER	ALA	LEU	SER	LYS	ASP
PRO	ASN	GLU	LYS	ARG	ASP	HIS	MSE	VAL	LEU
LEU	GLU	PHE	VAL	THR	ALA	ALA	GLY	ILE	THR
HIS	GLY	MSE	ASP	GLU	LEU	TYR	LYS		

Figura 33. Secuencia de la proteína fluorescente verde silvestre. Secuencia proteica compuesta de 238 aminoácidos. En rojo se destaca la secuencia motivo de unión a SPAK [(R/K)Fx(V/I)] . Los aminoácidos que forman el cromóforo se encuentran subrayados.

EGFP, lo cual originó un resultado positivo (Anexo A). Sin embargo, en su momento se descartó la posibilidad de una co-inmunoprecipitación, aludiendo a un corrimiento de la banda obtenida. Frente a los antecedentes descritos anteriormente, este ensayo corrobora el hecho de que la proteína kinasa SPAK interacciona con el motivo de unión presente en la proteína fluorescente.

Desde otro punto de vista, el descubrimiento de que la proteína fluorescente verde y sus variantes de colores, tenían un sitio de unión a SPAK, daba cuenta de que ambas técnicas puestas en marcha habían sido excelentemente montadas, debido a que se habían creado los mejores controles positivos. Además, esta situación evidenciaba efectivamente que el sitio de unión a SPAK es un blanco para la quinasa y si la secuencia del canal CIC-2 posee este sitio de consenso, deberíamos determinar la interacción de proteínas utilizando otro epítipo fusionado a la secuencia de la proteína del canal completo. Si bien es cierto, los ensayos de co-inmunoprecipitación, propuestos y realizados con el epítipo V5 fusionados a CR1 y la variante de empalme (CR5), no arrojaron el resultado esperado, si no más bien se obtuvo mucho fondo o *background*. Sin embargo, es posible mejorar las condiciones de inmunoprecipitación y detección, y con ello contribuir a la visualización de una posible banda correspondiente al inmunoprecipitado (Anexo B).

Por otro lado, los resultados obtenidos coinciden con la expresión de co-localización del canal CR1 y la proteína quinasa SPAK observada por microscopía confocal, en la cual se aprecia un patrón de co-expresión punteado y probablemente en membrana. Cabe pensar que si existiera una posible interacción de la quinasa con el canal, además de la interacción con la proteína fluorescente, la expresión de co-localización debiera ser mayor a la observada. Sin embargo, antes de afirmar que dicha situación entre el canal y la quinasa no ocurre, debemos recordar que

gran parte de las interacciones fisiológicas son transitorias y débiles, por consecuencia, la detección de dichas interacciones está frecuentemente en el margen de error de la observación.

De acuerdo a los resultados obtenidos podríamos concluir que no existe una interacción proteína-proteína entre el canal CR1 y la proteína quinasa SPAK, bajo un sistema *in vitro*, debido a que en los ensayos realizados con las contrucciones del canal fusionado al epítipo V5 no se determinó co-inmunoprecipitación. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de dicha interacción, pues como se mencionó anteriormente, para afirmar el hecho que un evento ocurra o no debemos demostrarlo por más de una técnica experimental. Se debe acentuar que pese a la importancia que poseen este tipo de interacciones transitorias, son mucho más complejas de estudiar, debido a que las condiciones responsables para que ocurra dicho evento deben ser primeramente identificadas (Nooren & Thornton, 2003). Una maniobra posible de utilizar es el uso de reactivos que provoquen un reacción de entrecruzamiento entre proteínas (*cross-link*). Asimismo también es posible utilizar otros pares de fluoróforos para realizar experimentos de FRET como por ejemplo DsRed (rojo) y HcRed (rojo lejano) o utilizando anticuerpos como C₃ y C₅.

Finalmente los resultados funcionales de mutaciones sitio dirigidas que eliminan el sitio de consenso o lo crean cuando no existe son muy concordantes. La falta del sitio de consenso genera una cinética de cierre mas rápida que cuando éste está presente. La hipótesis alternativa a que los datos no resulten de la acción de la SPAK es que el cambio conformacional provocado por las mutaciones afecte *per se* la cinética de cierre del canal.

5.2. Proyección del trabajo

Los conocimientos que se generen mediante el presente trabajo podrían ser la base para estudios de interacción proteína-proteína y en particular la continuidad del estudio de interacción entre el canal ClC-2 y la proteína quinasa SPAK. La determinación de tal evento podría ser útil para comprender el mecanismo por el cual se regula el canal de cloruro ClC-2, ya que teniendo establecido las bases por las cuales se genera el cierre del canal, se podría trazar la dinámica del mecanismo de compuerta o gates de ClC-2.

ANEXO A

Experimento control de co-inmunoprecipitación de SPAK-HA y Task-2-EGFP.

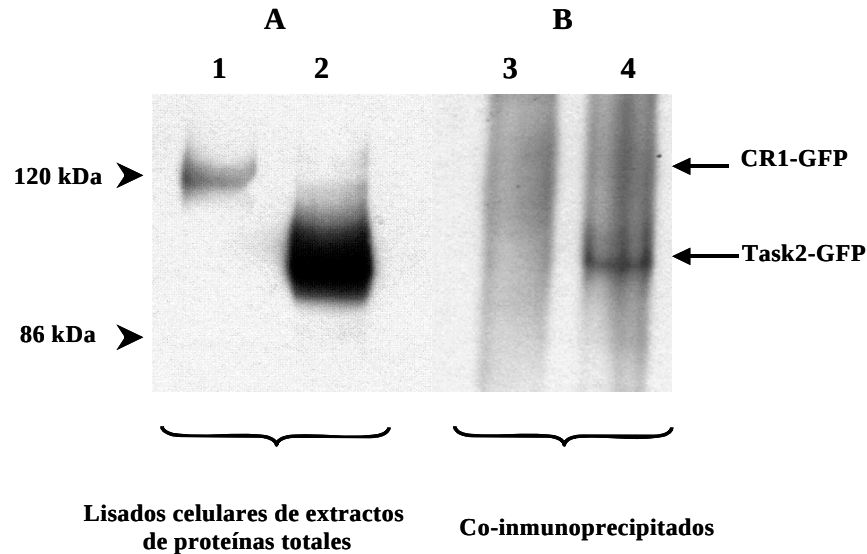


Figura A. Análisis de Western blot de co-inmunoprecipitación de Task-2. Se cotransfectaron células Hek-293 con los plasmidios: pCR3.1-rSPAKHA y pEGFP-CR1, pCR3.1-rSPAKHA y pEGFP-Task2. Para co-inmunoprecipitar se utilizó el anticuerpo anti-HA (clon 3F10) monoclonal de rata y la proteína G PLUS-Agarosa. El Western blot se realizó utilizando como anticuerpo primario anti-GFP policlonal de conejo y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP. El anticuerpo anti-GFP reconoce una banda de ~120 kDa para CR1 y de ~90 kDa para Task-2. **A)** lisados celulares de extractos de proteínas totales y **B)** experimentos de co-inmunoprecipitación. Línea 1-2: lisado de extractos de proteínas totales de los experimentos a y b. Línea 3: experimento a de co-inmunoprecipitación de CR1-EGFP y SPAK-HA; línea 4: experimento b de co-inmunoprecipitación de Task2-EGFP y SPAKHA (n= 2). Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

ANEXO B

Experiemento control de la proteína A y G-agarosa y anticuerpos secundarios.

Para determinar la procedencia de la bandas inespecíficas y el fondo presente en los Western blot, cuando se trabaja con el par de enticuerpos anti-HA y anti-V5, reveló que el anticuerpo secundario anti-IgG de rata, utilizado para detectar el anticuerpo anti-HA monoclonal, reacciona inespecíficamente con la proteína G y no así a la proteína A, generando un fondo y bandas inespecíficas a la altura de 86 y 47 kDa (figura B1).

Buscando una forma de mejorar los ensayos de co-inmunoprecipitación para las construcciones con V5, se realizaron controles para determinar si existe reacción cruzada entre los anticuerpos, dado que la inmunoglobulina de ratón con la cual se inmunoprecipita es muy similar estructuralmente a la inmunoglobulina de rata con la cual se detecta en el Western blot. El control realizado mediante dot blot determinó la existencia de reacción cruzada por parte de los anticuerpos de rata y ratón. El anticuerpo anti-IgG de ratón reconoce al anticuerpo anti-HA monoclonal de rata, no así al anticuerpo anti-IgG de conejo. Producto de lo anterior se probaron distintas concentraciones de suero de rata (gentilmente donado por el Dr. Hugo Folch, del Instituto de Inmunología) para preabsorber el anticuerpo anti-IgG de ratón. Como se muestra en la figura B2, utilizando una condición mínima de 0,1% de suero de rata es posible bloquear cualquier reacción cruzada de los anticuerpos. Para verificar que la absorción del anticuerpo secundario no había bajado el título, se realizó un ensayo de Western blot, para probar distintas diluciones del anticuerpo anti-IgG de ratón preabsorbido con 0,1 % de suero de rata. Como se aprecia en la figura B3, el título del anticuerpo no disminuyó, siendo la dilución usual, 1: 25.000, la dilución a la cual se obtiene una mejor resolución.

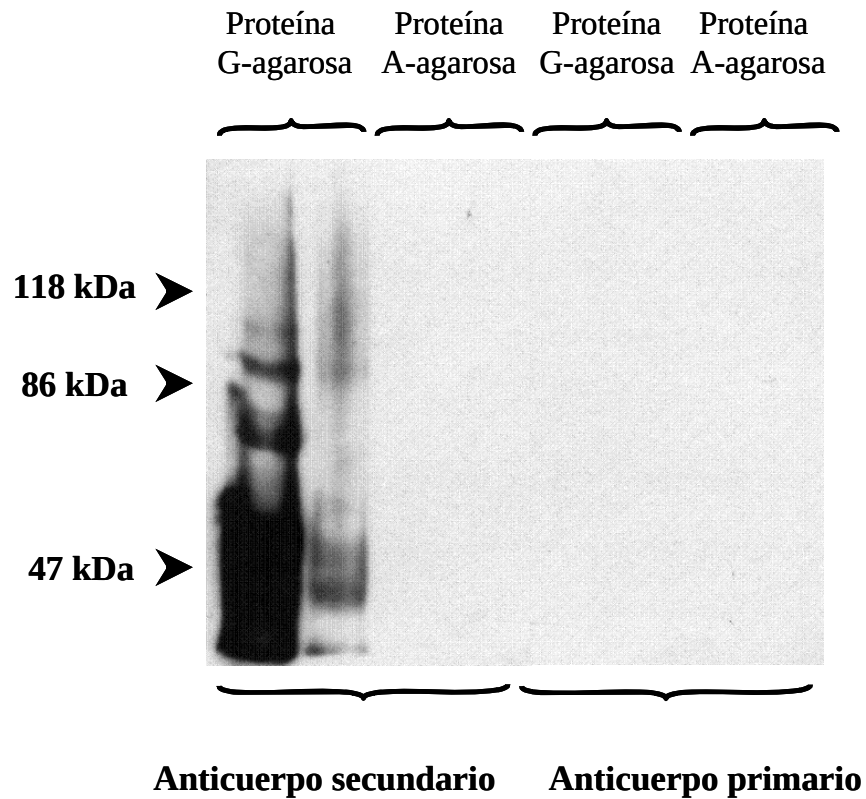


Figura B.1. Análisis de Western blot para determinar reacción inespecífica. La proteína G-agarosa y la proteína A-agarosa son inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-V5, en ausencia de muestras de proteínas. Cada conjunto de proteínas se evaluó considerando una condición con y sin lavado del inmunoprecipitado. Ambos conjuntos de proteínas se evaluaron solo frente al anticuerpo primario anti-HA de rata o frente al anticuerpo secundario anti IgG de ratón. Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

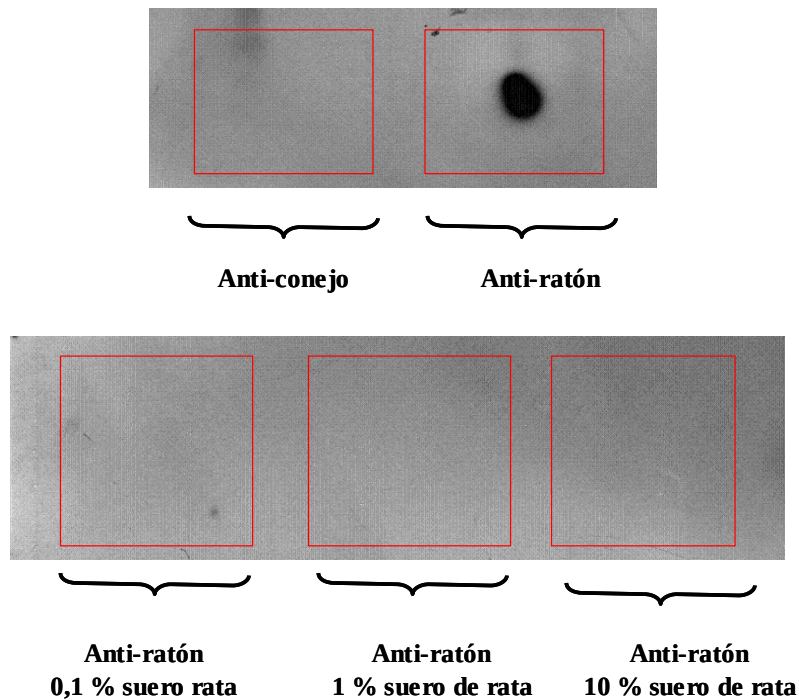


Figura B.2. Dot blot del anticuerpo anti-IgG de ratón. Se aplicó directamente en forma de una pequeña gota, una solución concentrada de anticuerpo anti-HA (3F10) monoclonal sobre la membrana de nitrocelulosa. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o *dot*. Bloqueada la membrana, se incubó con los distintos anticuerpos secundarios conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) durante 1 hora en agitación.

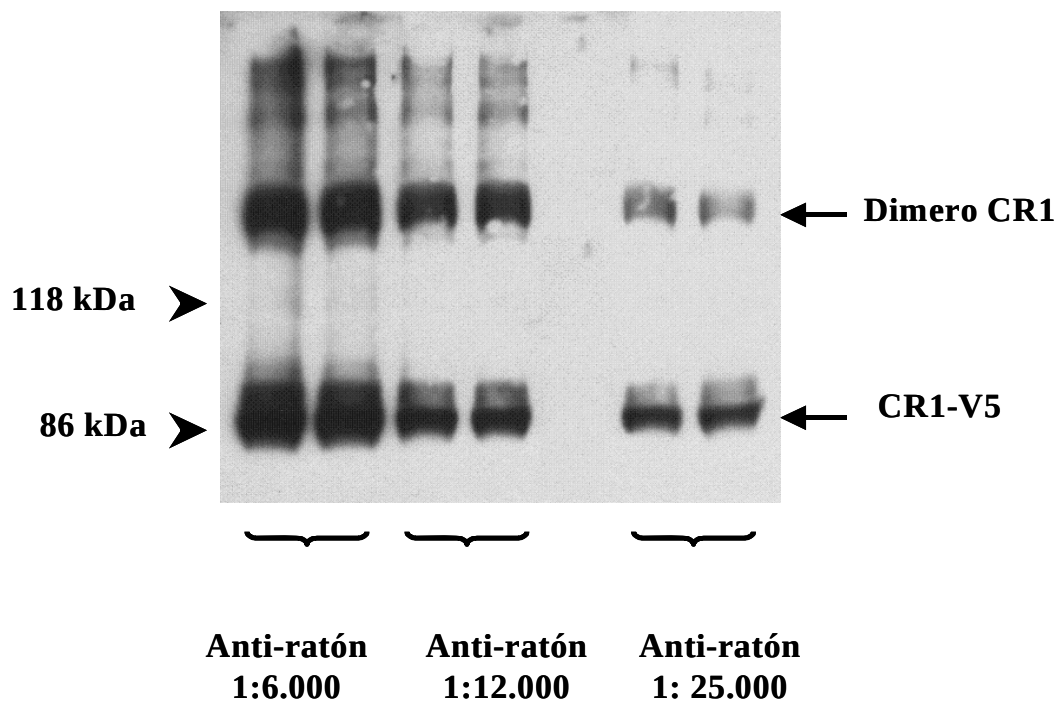


Figura B.3. Análisis de Western blot para evaluar título del anticuerpo preabsorbido.

Extracto de proteínas totales provenientes de una transfección aguda con pcDNA3.1-V5-CR1, son separadas en un gel de poliacrilamida de SDS-PAGE, cargando en cada pocillo 20 µg de proteínas totales. El Western blot se detectó con el anticuerpo primario anti-V5 monoclonal y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón preabsorbido con 0.1 % de suero de rata en distintas diluciones por duplicado. Las puntas de flecha indican el marcador de peso molecular.

6. LITERATURA CITADA

Adams, J.A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev.*, 101, 2271–2290.

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

Cid, LP., Niemeyer, M.I, Ramirez, A. and Sepúlveda F.V. (2000) Splice variants of ClC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am. J. Physiol.*, 279, 1198-1210.

Chu, S. and Zeitlin, P.L. (1997). Alternative mRNA splice variants of the rat ClC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of ClC-2. *Nucleid Acid Res.*, 25, 4153-4159.

Coates, P.J. and Hall, P.A. (2003). The yeast two-hybrid system for identifying protein–protein interactions. *J Pathol.*, 199, 4–7.

Dan, I., Watanabe, N.M. and Kusumi, A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.*, 11, 220–230.

Denton, J., Nehrke, K., Rutledge, E., Morrison, R. and Strange, K. (2004). Alternative splicing of N- and C-termini of a *C. elegans* ClC channel alters gating and sensitivity to external Cl⁻ and H⁺. *J Physiol.*, 555, 97–114.

Denton, J., Nehrke, K., Yin, X., Morrison, R. and Strange, K. (2005). GCK-3, a newly identified Ste20 kinase, binds to and regulates the activity of a cell cycle-dependent ClC anion channel. *J Gen Physiol.*, 125, 113–125.

Dowd B. and Forbush B. (2003). PASK (Proline-alanine-rich STE20/SPS1-related kinase), a Regulatory Kinase of the NA-K-Cl Cotransporter (NKCC1). *J.Biol.Chem.*, 278, 27347-27353.

Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T. and 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.

Fu, H. (2004). Protein-Protein Interactions: Methods and Applications. Humana Press Inc., New York. 532.

Gagnon, K., England, R. and Delpire, E. (2006). Volume sensitivity of cation-chloride cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: SPAK and WNK4. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 290, C134-C142.

Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. and Jentsch, T.J. (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*, 360, 759–762.

Golbang, A., Cope, G., Hamad, A., Murthy, M., Liu, C., Cuthbert, A. and O`Shaughnessy, K. (2006). Regulation of the expression of the Na/Cl cotransporter by WNK4 and WNK1: evidence that accelerated dynamin-dependent endocytosis is not involved. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 291, F1369-F1376.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98, 4569-4574.

Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 348, 510-514.

Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schierver, A. and Yamada, H. (1999). The ClC chloride channel family. *Eur. J. Physiol.*, 437, 783-795

Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. and Zdebik, A.A. (2002) Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol. Rev.*, 82, 503–568.

Johnston, A.M., Naselli, G., Gonez, L.J., Martin, R.M., Harrison, L.C. and DeAizpurua, H.J. (2000). SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene*, 19, 4290-4297.

Jordt, S.E. and Jentsch, T.J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16, 1582-1592

Lakowicz, J. R. (1999). Energy transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2^a Ed. Plenum, New York. 367–394.

Li, Y., Hu, J., Vita, R., Sun, B., Tabata, H. and Altman, A. (2004). Spak kinase is a substrate and target of PKC θ in T-cell receptor-induced AP-1 activation pathway. *EMBO J.*, 23, 1112-1122.

Llopis, J., Vaquero, C.F., Domingo, B., Picazo, F., Pérez, J.M. and Tranque, P. (2005). Análisis de la dinámica celular con proteínas fluorescentes. www.biojournal.net.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science.*, 298, 1912–1934.

Middleton, R.E., Pheasant, D.J. and Miller, C. (1996) Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature*, 383, 337-340.

Nelson, D. L. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^a Ed. freeman w h & co, New York. 109-357.

Nilius, B. and Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.*, 177(2), 119-147.

Nooren, I.M. and Thornton, J.M. (2003). Diversity of protein-protein interaction. *EMBO J.*, 22, 3486-3492.

Mindell, J.A. and Maduke, M. (2001). ClC chloride channels. *Genome Biol.* 2. reviews3003.1-3003.6.

Pawson ,T.and Nash, P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction.*Genes Dev.*,14, 1027-47.

Piechotta, K., Lu, J. and Delpire, E. (2002). Cation Chloride Cotransporters Interact with the Stress-related Kinase Ste20-related Proline-Alanine-rich Kinase (SPAK) and Oxidative Stress Response 1 (OSR1). *J. Biol. Chem.*, 277, 50812-50819.

Piechotta, K., Garbarini, N., England, R. and Delpire, E. (2003). Charecterization of the Interaction of the Stress Kinase SPAK with the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Cotrnasporter in the Nervous System. *J. Biol. Chem.*, 278, 52848-52856.

Pons, T. (2003). Interacciones proteína-proteína: bases de datos y métodos teóricos de predicción. *Biotecnología Aplicada.*, 20, 201-208.

Push, M., Jordt, S.E., Stein, V. and Jentsch, T.J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *Eur. J. Physiol.*, 515, 341-353.

Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C. and Simon, S. (2001). The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature.*, 409, 211-5.

Selvin, S. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature.*, 7, 730-734.

Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. A. (2000) Network of protein-protein interactions in yeast. *Nature Biotechnol.*, 18, 1257-61.

Strange, K., Denton, J. and Nehrke, K. (2005). Ste20-Type Kinases: Evolutionarily Conserved Regulators of Ion Transport and Cell Volume. *Physiology.*, 21, 61-68.

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

Tsien, RY. (1998). The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.*, 67, 509-544.

Tsutsumi, M., Skinner, M. K. and Sanders-Bush, E. (1989). Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. *J. Biol.Chem.*, 264, 9626–9631.

Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kosaka, T., Kayahara, T. and Nakano, K. (2000). Proline-and Alanine-rich STE20-related Kinase Associates with F-actin and Translocates from the Cytosol to Cytoskeleton upon Cellular Stresses. *J. Biol. Chem.*, 275, 9157-9162.

Ushiro, H., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Kayahara, T. and Nakano, K. (1998). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Neurons and Transporting Epithelia. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355, 223-240.

Valverde, M.A. (1999). ClC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millenium. *Curr Op Cell Biol.*, 11, 509-516.

Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A. and Alessi, D. R. (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem. J.*, 391, 17–24

Vogel, S. S., Thaler, C. and Koushik, S. V. (2006). Fanciful FRET. *Sci. STKE*. 2.
www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2006/331/re2

von Mering C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S.G. and Fields, S. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature.*, 417, 399-403.