

0287

DONACION	
No Reg	028709
Catalogador	<i>[Signature]</i>
Fecha	17/2/10



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA

**“REGULACIÓN DE CANALES DE CLORURO
ACTIVADOS POR CALCIO”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

PRESENTA

Q.F.B. Maribel del Carmen Hervert García

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Pérez Cornejo

ASESORES

Dr. Jorge Arreola Gómez

Dr. Ricardo Espinosa Tanguma



La presente tesis se realizó conjuntamente en el Laboratorio No. 17 del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Biofísica del Instituto de Física, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la tutoría de la Dra. Patricia Pérez Cornejo. Se recibió apoyo del Proyecto CONACYT 45895 (PPC). Además se contó con el Apoyo de Fondos de Recursos Concurrentes-UASLP Número C06-FRC-02-11.11 y una beca CONACYT con número de registro 198204 (MCHG).

COMITÉ TUTELAR

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo

ASESORES DEL PCBB

Dr. Jorge Arreola Gómez

Dr. Ricardo Espinosa Tanguma

JURADO

Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo

Dr. Jorge Arreola Gómez

Dr. Ulises Meza Villanueva



JULIO DEL 2007

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha requerido de esfuerzo y dedicación por parte de la autora y su directora de tesis Dra. Patricia Pérez Cornejo, no hubiese sido posible la terminación de la tesis sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que citare a continuación y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Quiero expresar mi más sincera admiración y mi más profundo agradecimiento a la Dra. Patricia Pérez Cornejo. Además de ser una gran directora de tesis, ha sido capaz de transmitirme su pasión por la investigación en ciencias biomédicas.

Debo agradecerle a la Dra. Patricia Pérez Cornejo y al Dr. Jorge Arreola Gómez el haberme permitido participar en todas las actividades llevadas a cabo en el proyecto de tesis. Quisiera destacar especialmente el trato recibido por su parte y el cariño y comprensión mostrados en todo momento.

Al personal del laboratorio, especialmente a Carmen Hernández Carballo, por la colaboración prestada en todo momento para la realización de los experimentos.

Al laboratorio del Dr. Rubio, en especial a Dra. Alma por compartir sus conocimientos en la Técnica de Western Blot.

A mi familia y amigos quiero darles las gracias por haber estado a mi lado en todo momento con quienes he compartido tantas cosas dentro y fuera de la Universidad.

En general quisiera agradecer a todas y a cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo, sabemos que desde lo mas profundo de mi corazón les agradezco haberme brindado todo el apoyo, colaboración, animo y sobre todo cariño y amistad.

Al Laboratorio No.17 del Departamento de Fisiología de la facultad de Medicina y el Laboratorio de Biofísica del Instituto de Física, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, por permitirme realizar el trabajo experimental de tesis.

Por el apoyo recibido del proyecto CONACYT 45895 (PPC), y el apoyo recibido de los Fondos de Recursos Concurrentes-UASLP numero C06-FRC-02-11.11 y una beca CONACYT con un número de registro 198204 (MCHG).

DEDICATORIAS

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y tener una familia maravillosa.

A mis padres, Julio y Maribel, les agradezco su apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo, esta tesis es suya.

A mi hermana Blanca por la amistad y los sueños que hemos compartido, te quiero mucho pequeñita.

A mis hermanos Rosalba y Julio gracias por apoyarme siempre y estar conmigo los quiero mucho. A Luís y Roberto gracias por todos los momentos que hemos compartido.

A Lupita, Gris, George, Carmen y Ari por ser unos amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevare en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su alegría y su cariño. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y su amor por las ciencias biomédicas básicas. Especialmente a la Dra. Patricia Pérez Cornejo, al Dr. Jorge Arreola Gómez, y al Dr. Ricardo Espinosa Tanguma que me brindaron todo su apoyo en la realización de esta tesis.

INDICE GENERAL

PORTADA	i
AGRADECIMIENTO A CONACYT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
INDICE GENERAL	1
INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Canal de Cloruro dependiente de Calcio.	7
Funciones del CaCC.	9
Secreción de fluidos y electrolitos.	10
CaCCs en ovocitos de <i>Xenopus</i> .	11
Regulación de CaCCs.	13
Interacción entre CaCC y CFTR.	16
Mecanismo de inhibición de CaCC por CFTR.	18
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	19
Hipótesis.	19
Objetivo general.	19
Objetivos específicos.	19
METODOLOGIA	20
1. Obtención de la secuencia que codifica para la región carboxi terminal del dominio regulador.	20
1.1 Amplificación del DNA patrón phCFTR-EGFP-N1.	20
1.1.1 Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i> TOP10.	20
1.1.2 Extracción del DNA plasmidico.	20
1.1.3 Linearización del DNA.	21
1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
1.2.1 Análisis del resultado de PCR. Electroforesis en geles de agarosa.	23
1.2.2 Preparación de geles de agarosa.	24
1.3 Clonación del fragmento de PCR.	25
1.3.1 Ligación entre el producto de PCR y el vector pEXP5-NT/TOPO.	26
1.3.2 Purificación del DNA plasmidico.	27
1.3.3 Determinación de la concentración de DNA.	27
1.3.4 Digestión enzimática de fragCFTR-pEXP5.	27
2. Síntesis <i>in vitro</i> del péptido regulador 50RC.	28
2.1 Transcripción y Traducción <i>in Vitro</i> .	28
2.1.1 Síntesis de proteína 50RC.	29

2.1.2	Precipitación de proteínas con Acetona.	30
2.1.3	Electroforesis de Proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida.	30
2.2.1	Western Blot.	30
2.2.2	Tinción con Azul brillante de Comassie.	32
2.2.3	Tinción con Nitrato de Plata.	32
2.2.4	Transferencia.	33
2.2.5	Inmunoblot.	34
2.2.6	Detección con Fosfatasa Alcalina.	34
2.3	Purificación del péptido de interés.	35
2.3.1	Purificación de 50RC.	36
2.3.2	Cuantificación del péptido 50RC.	36
3.	Síntesis <i>in vitro</i> del RNAm que codifica para el péptido 50RC.	37
3.1	Clonación del fragmento de PCR.	37
3.1.1	Obtención y análisis del DNA plasmidico.	38
3.1.2	Linearización del constructo fragCFTR-pCR2.1.	38
3.1.3	Extracción con Fenol-Cloroformo.	39
3.1.4	Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	39
3.2	Transcripción <i>in vitro</i> .	39
3.2.1	Precipitación de mRNA con Cloruro de Litio.	40
3.2.2	Visualización del mRNA.	40
4.	Evaluar el efecto inhibitor del péptido 50RC sobre las corrientes CaCC endógenas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	41
4.1	Obtención de los folículos ováricos.	41
4.1.1	Preparación de los ovocitos para la microinyección del mRNA.	41
4.2	Microinyección de los ovocitos.	41
4.3	Fijación de voltaje con dos microelectrodos.	42
4.4	Determinación del tamaño de muestra.	43
RESULTADOS		45
	Construcción del plasmido recombinante que exprese la región carboxi terminal del dominio R proveniente del CFTR de humano.	45
	Síntesis <i>in vitro</i> de mRNA que codifica para la región carboxi terminal del dominio regulador.	50
	Evaluación del efecto inhibitor del péptido 50RC sobre las corrientes endógenas CaCC en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	53
	Análisis estadístico.	56
DISCUSIÓN		58
CONCLUSIONES		61
BIBLIOGRAFIA		62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de CaCC.	8
Figura 2. Activación de CaCC por Ca^{+2} y voltaje.	8
Figura 3. Movimiento transepitelial de Cloruro en células acinares de la glándula salival.	11
Figura 4. Modelo de la distribución y homeostasis de calcio en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	13
Figura 5. Esta imagen demuestra dos clases de canales de cloruro.	14
Figura 6. Estructura del canal CFTR.	15
Figura 7. Regulación de la I_{CaCC} por CFTR.	16
Figura 8. Comparación de I_{CaCC} con diferentes constructos de CFTR.	17
Figura 9. Representación esquemática del vector pEXP5-NT/TOPO.	25
Figura 10. Transformación de células TOP10 <i>E. coli</i> y purificación del plasmido (fragCFTR-pEXP5).	26
Figura 11. Sistema Expressway Cell Free <i>E. coli</i> System utilizado en la producción de proteínas recombinantes.	28
Figura 12. Representación de las capas de material ("sandwich") usadas para la transferencia de proteínas del gel a la membrana de PVDF.	33
Figura 13. Esquema del proceso de purificación utilizando el sistema ProBond Purification.	35
Figura 14. Mapa del vector pCR2.1-TOPO.	37
Figura 15. Protocolo de pulsos para el registro de corrientes.	43
Figura 16. Curva I-V de las I_{CaCl} en presencia de ionomicina $10 \mu\text{M}$ en ovocitos de <i>Xenopus</i> .	44
Figura 17. DNA pHCFTR-EGFP-N1 linearizado con la enzima NotI.	45
Figura 18. Fragmento de 150 pb que codifica para la región carboxi-terminal del dominio R de la proteína CFTR.	46
Figura 19. Análisis de restricción del constructo fragCFTR-pEXP5.	47
Figura 20. Secuenciación del constructo fragCFTR-pEXP5.	47
Figura 21. Visualización del péptido 50RC en un gel de SDS-Poliacrilamida teñido con Azul de Comassie.	48
Figura 22. Visualización del péptido 50RC en gel SDS-Poliacrilamida que fue teñido con Nitrato de Plata.	49
Figura 23. Detección del péptido 50RC por medio de Western blot.	50
Figura 24. Análisis de restricción del constructo fragCFTR-pCR2.1.	51
Figura 25. Secuenciación del constructo fragCFTR-pCR2.1.	52
Figura 26. Linearización del plasmido recombinante fragCFTR-pCR2.1.	52
Figura 27. Transcrito obtenido del constructo fragCFTR-pCR2.1	53
Figura 28. Trazos de corriente a través de CaCC obtenidos de un ovocito	54

representativo.

Figura 29. Curvas I-V de ovocitos inyectados con agua o mRNA.	55
Figura 30. Inhibición de I_{CaCl} causada por el péptido 50RC.	55
Figura 31. Efecto del mRNA para 50RC sobre la amplitud de la corriente activada por ionomicina.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitio de reconocimiento de NotI.	20
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados con el programa Vector NT1.	22
Tabla 3. Condiciones para la reacción de PCR.	23
Tabla 4. Temperaturas del proceso de PCR.	23
Tabla 5. Eficiencia de separación de separación en diferentes porcentajes de agarosa.	24
Tabla 6. Soluciones utilizadas en electroforesis con geles de agarosa.	24
Tabla 7. Mezcla para ligar el producto de PCR con el vector pEXP5-NT/TOPO.	26
Tabla 8. Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción BSU36I y RsaI.	28
Tabla 9. Mezcla de reacción para la síntesis del péptido 50RC.	29
Tabla 10. Ingredientes adicionales para la reacción de síntesis del péptido 50RC.	29
Tabla 11. Soluciones utilizadas en los experimentos de Western blot.	31
Tabla 12. Componentes de gel SDS-Poliacrilamida.	31
Tabla 13. Soluciones utilizadas para realizar tinción con Nitrato de Plata.	32
Tabla 14. Composición del Amortiguador de Transferencia.	33
Tabla 15. Soluciones utilizadas para la técnica de Inmunoblot.	34
Tabla 16. Reacción de ligación entre el producto de PCR y el vector pCR2.1-TOPO.	37
Tabla 17. Sitio de reconocimiento para la enzima Hind III.	38
Tabla 18. Reacción de Transcripción con el Kit MMessage mMachine.	40

RESUMEN

Los pacientes con Fibrosis Quística padecen de un transporte defectuoso de electrolitos en epitelios debido a que el canal de cloruro denominado CFTR no funciona correctamente. Sin embargo, en estos pacientes la secreción de saliva no se encuentra afectada ya que las células acinares de las glándulas salivales expresan tanto CFTR como canales de Cl^- activados por Ca^{+2} (CaCC). Los CaCC se activan por incrementos en Ca^{+2} citosólico y cambios en el potencial de membrana. En ratones $\text{CFTR}^{-/-}$ la magnitud de la corriente a través de CaCC aumenta, lo que indica que CFTR regula la función de CaCC (2). Esta regulación parece deberse a un segmento de 50 aminoácidos localizado en el dominio regulador (R) de CFTR (3). En nuestro trabajo mostramos que la inyección del mRNA que codifica para el péptido 50RC derivado del dominio R del CFTR puede inhibir la actividad de CaCC. La región carboxi-terminal del dominio R (150 pb) que codifica 50RC se amplificó a partir del gen CFTR de humano usando la técnica de PCR. La región fue subclonada en los vectores pCR2.1 y pEXP5 para producir el mRNA y una proteína de fusión HisG/50RC, respectivamente. La producción *in vitro* de HisG/50RC se corroboró por medio de un Western utilizando un anticuerpo comercial. Para evaluar la efectividad de 50RC sobre la actividad de CaCC, se inyectaron ovocitos de rana *Xenopus* con el mRNA y posteriormente se midieron las corrientes de cloruro utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. En este ensayo se observó que la inyección de 50 ng de mRNA en los ovocitos, disminuyó en un 38% la amplitud de las corrientes de cloruro CaCC previamente activadas con 10 μM de ionomicina. Concluimos que el la inyección del mRNA para 50RC reproduce el efecto regulador de CFTR sobre CaCC y que la regulación probablemente se lleve a cabo mediante una interacción proteína-proteína.

INTRODUCCIÓN

El transporte de las sustancias hacia dentro y fuera de la célula o entre diferentes compartimentos intracelulares se lleva a cabo por proteínas de membrana como bombas, transportadores y canales iónicos.

Los canales iónicos están formados por una o varias subunidades proteicas. Cuando el canal iónico se abre, forma un poro acuoso que se extiende a través del espesor de la membrana. En esta ruta de conducción se encuentra un filtro de selectividad iónica que permite el flujo preferencial de un tipo específico de ion. De esta manera se tienen canales selectivos para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

El flujo de iones a través del poro se lleva a cabo a una gran velocidad, hasta 10^6 iones por segundo. Esta eficiencia se da gracias a que los iones fluyen pasivamente a favor de un gradiente electroquímico sin gasto de energía metabólica. La probabilidad con que se dan los eventos de apertura y cierre del poro esta controlada por un sensor que puede ser eléctrico, químico o mecánico. En el caso de los canales activados por voltaje, el sensor incluye varios aminoácidos cargados los cuales se mueven dentro del campo eléctrico de la membrana durante la apertura o cierre del canal.

Los canales iónicos cumplen funciones esenciales en muy diversas células. Así por ejemplo, en mamíferos determinan procesos como la excitabilidad del nervio y del músculo, la secreción hormonal, la proliferación celular, la transducción sensorial, el control del equilibrio del agua corporal y de los electrolitos, la regulación de la presión sanguínea y aún procesos como el aprendizaje y la memoria.

Canal de Cloruro dependiente de Calcio

Los canales de cloruro dependientes de calcio (CaCCs) también son dependientes de voltaje y se caracterizan por tener una conductancia pequeña entre 0.5 a 5 pS. La secuencia de permeabilidad que los caracteriza es la siguiente: $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$. Los CaCCs tienen una activación lenta con dependencia temporal (Fig. 1). Por otro lado la cinética de estas corrientes es claramente dependiente de voltaje y Ca^{2+} . Los canales se activan rápidamente a altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por fuertes depolarizaciones. Así, se sabe que el Ca^{2+} incrementa significativamente la probabilidad de apertura del canal a concentraciones relativamente altas ($>5 \mu\text{M}$) (Fig. 2). Además, se ha observado que a potenciales positivos la afinidad por Ca^{2+} del canal se ve incrementada por lo que al incrementar el Ca^{2+} intracelular la activación se acelera y la rectificación disminuye (2).

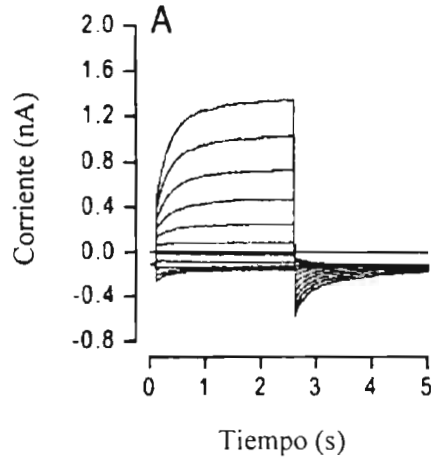


Figura 1. Cinética de CaCC (2).

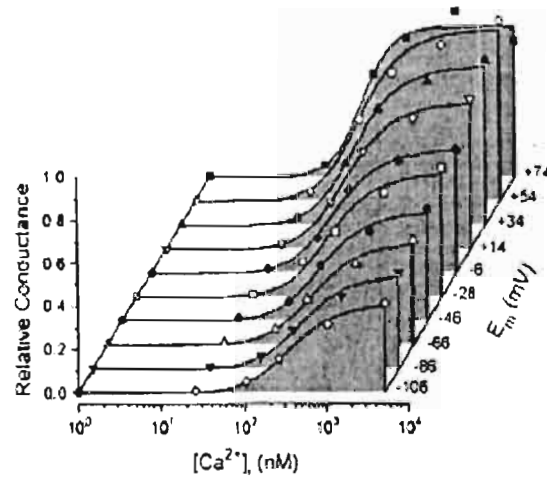


Figura 2. Activación de CaCC por Ca^{2+} y voltaje. La conductancia relativa de canal CaCC aumenta conforme a la concentración de Ca^{2+} citosólico se eleva y el potencial de membrana se vaya depolarizando (11).

Los CaCCs son bloqueados por aniones hidrofóbicos como antraceno-9-carboxílico (A9C), difenilamina-2-acido carboxílico (DPC), 4,4-diisotiocyanostilbene-2-2'-acido disulfónico (DIDS) y ácido nifumico (NFA) por el lado extracelular. La potencia de los bloqueadores es de la siguiente manera: $\text{NFA} > \text{A9C} > \text{DIDS} > \text{DPC}$ (mostrando una EC_{50} de 10.1, 18.3, 48 y 111 μM respectivamente.) (2).

Funciones del CaCC

Los CaCCs participan en diversas funciones celulares tales como:

a) La generación del potencial de fertilización en ovocitos. Este potencial previene la fusión adicional de espermias durante la fertilización, los niveles de Ca^{2+} citoplásmico es el responsable de el bloqueo de la poliespermia a dos niveles: el primero activa las corrientes de cloruro dependientes de calcio (I_{CaCl}), las cuales despolarizan la membrana, a este proceso se llama Potencial de fertilización y bloquea la entrada del esperma; el segundo nivel, induce la fusión de gránulos corticales los cuales son grandes vesículas que contienen proteasas y glicoproteínas localizadas en la corteza del ovocito lo cual provee un largo tiempo de bloqueo de fusión de espermias (12).

b) Secreción de fluidos y electrolitos en glándulas salivales, lacrimales y páncreas entre otros. Estos tejidos secretan un fluido primario rico en NaCl; la secreción del fluido es dependiente de Ca^{2+} y es iniciada por el neurotransmisor parasimpático Acetilcolina. El incremento en Ca^{2+} intracelular es inducido por activación de receptores muscarínicos los cuales están acoplados a la producción de IP_3 . El IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares el cual subsecuentemente activa a CaCC y la consiguiente salida de Cl^- a través de la membrana apical. La salida de Cl^- impulsa el movimiento paracelular de Na^+ y la salida de agua, resultando en la secreción de un fluido salado (11).

c) Generación del potencial de acción en miocitos cardíacos. El CaCC juega un papel importante en la repolarización del potencial de acción de los miocitos cardiacos. El Ca^{2+} intracelular y las I_{CaCl} activan la contracción en el corazón de mamífero. En estas células se expresa una corriente saliente la cual se ha demostrado que es una corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+} que se activa a potenciales positivos produciendo un influjo de Cl^- y un cambio en el potencial de membrana hacia valores negativos. Las corrientes entrantes de Ca^{2+} (I_{Ca}) normalmente se opone a la I_{CaCl} y la depolarización causa rápidamente una inactivación de la I_{Ca} (1).

d) Excitabilidad neuronal. CaCC se expresa en el sistema nervioso central, neuronas del hipocampo, simpático y parasimpático también en neuronas del sistema sensorial incluyendo olfativo, fotorreceptor y neuronas ganglionares de la raíz dorsal (DGR). El efecto de la activación de los CaCCs es muy variado. La activación de la conductancia de Cl^- podría estabilizar el potencial de las neuronas o podría depolarizar las neuronas que activan la salida de Cl^- . El efecto de la activación de CaCC podría producir reducción en excitabilidad, frecuencia del potencial de acción y la entrada de Ca^{2+} por la vía de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (10).

e) Transducción olfatoria. Los receptores acoplados a proteínas G en la membrana de los cilios de las neuronas olfativas activan a la adenilato ciclasa, la cual produce AMPc. Este mensajero a su vez activa canales dependientes de nucleótidos cíclicos que permiten el paso de Na^+ y Ca^{2+} al interior de la célula. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular activan CaCCs lo que causa un eflujo de Cl^- que depolariza la célula. La función fisiológica de los CaCCs con los receptores neuronales olfatorios (ORNs) se produce cuando un olor depolariza a los ORNs. Primero los cationes, incluyendo Ca^{2+} , entran al cilio a través de los canales que unen nucleótidos cíclicos (CNG), segundo, el Ca^{2+} que entra al cilio se une al canal de Cl^- , activando la salida de Cl^- de cilio. Hay tres hipótesis propuestas para explicar el papel de CaCC en la transducción olfatoria que son : 1) Amplificación de la señal, 2) Señal de reducción de ruido y, 3) Respuesta constante ante el ambiente variable (19).

f) Tono vascular. Se ha visto que en células del músculo liso CaCC participa en la regulación del tono y la contracción estimulada por agonistas (8).

Secreción de fluidos y electrolitos

Uno de los tejidos donde CaCC participa de manera clara es la secreción de saliva. La saliva provee protección e hidratación de las estructuras mucosas dentro de la cavidad oral, orofaríngea y esófago. Así mismo, la saliva ayuda a solubilizar los alimentos y es por lo tanto importante para la digestión. En glándulas salivales la secreción de saliva es producida por las células acinares, que conforman los acinos, los cuales forman las unidades secretoras de la glándula. Los acinos están a su vez formados por células acinares las cuales secretan un fluido típicamente acuoso que contiene agua, electrolitos, moco y una compleja mezcla de enzimas. Las principales glándulas salivales incluyen las glándulas parotida, submandibular y sublingual. Cada una de estas glándulas produce aproximadamente 25, 70 y 5% de la saliva total, respectivamente. En nuestro organismo el volumen total de saliva secretado por día es de 1-2 litros.

Para la producción de saliva el movimiento transepitelial de cloruro, a través de las células acinares, es primordial. Las células acinares poseen en su membrana basolateral varios transportadores como el triple cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, los cuales acumulan cloruro en el interior de estas células. Poseen además la bomba de Na^+/K^+ que produce un gradiente químico de Na^+ . Cuando la glándula es estimulada por agonistas muscarínicos la secreción se inicia con la movilización de Ca^{2+} que provoca un incremento en el Ca^{2+} intracelular (8). El incremento en Ca^{2+} activa tanto la apertura de canales de K^+ en la membrana basolateral como la apertura de canales de cloruro localizados en la membrana apical. De esta manera, la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} permite que el cloruro previamente acumulado salga de la célula, mientras que la activación de los canales de K^+ es necesaria para mantener la fuerza electroquímica que impulsa la salida de Cl^- (15). La

diferencia del potencial transepitelial, es creada por el cruce de Cl^- en la membrana de la célula acinar así como la entrada de K^+ al fluido intersticial. La acumulación luminal de iones, genera además un gradiente transepitelial osmótico que promueve el movimiento de agua (15).

La activación de canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} es por lo tanto el mecanismo subyacente más importante para secreción de fluidos en glándulas salivales.

Sin embargo, en otros tejidos como son el de las vías aéreas superiores, la secreción de fluidos es iniciada por un incremento en la concentración intracelular de AMPc (Fig. 3) y que la secreción puede ser significativamente aumentada cuando Ca^{2+} y AMPc son activados simultáneamente (8).

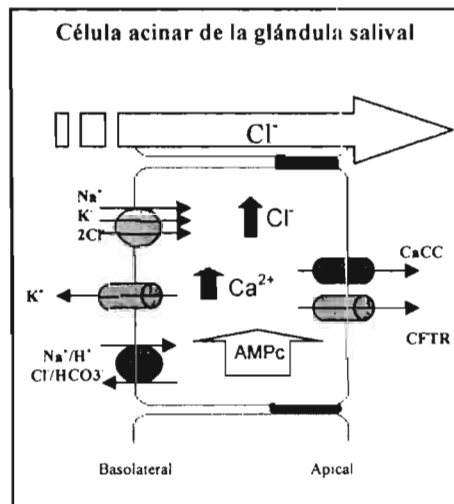


Figura 3. Movimiento transepitelial de Cloruro en células acinares de la glándula salival.

CaCCs en ovocitos de Xenopus

Los ovocitos de *Xenopus* son células que tienen membrana vitelina, células foliculares, epitelio entre otros. La característica significativa del ovocito es su naturaleza polarizada. Curiosamente el prominente polo negro/blanco, animal/vegetal. El ovocito tiene varios estadios, los estadios V y VI son los empleados para la microinyección del material de interés. La incalculable contribución de los métodos de microinyección de ovocito a permitido un rápido proceso en biología molecular y celular en las ultimas dos décadas (9).

Los ovocitos de *Xenopus laevis* han sido ampliamente utilizados como medios para la reproducción y la caracterización de proteínas heterólogas de fuentes tan diversas como virus, bacterias, las plantas, y los animales. Más particularmente, el uso de ovocitos ha sido

extremadamente fructuoso en la reproducción de la expresión de canales y de transportadores, aprovechándose de técnicas sensibles como por ejemplo electrofisiología (16).

En estudios de clonación molecular, la microinyección de mRNA en tejidos homólogos en ovocitos sirve para proveer evidencia para que se lleve a cabo la transcripción y posterior codificación del polipéptido deseado mientras que se establece la habilidad del ovocito para expresar la proteína biológicamente activa, la microinyección también puede mostrar el auto ensamblaje y la inserción del receptor o canal funcional a la membrana plasmática. La fidelidad del ovocito en la transcripción del mRNA podría también permitir cuantificación relativa de específicos mRNAs en varios tejidos o estados fisiológicos. El uso de los ovocitos para específicos bioensayos de mRNA a proveído de un invaluable esfuerzo en clonación molecular (9). Hay estudios recientes donde los ovocitos inyectados demostraron ser imprescindibles para el análisis de la transcripción, la traducción, el transporte de RNA/proteína, y la formación del canal iónico (18).

Los CaCCs fueron probablemente los primeros canales descritos en ovocitos de *Xenopus* hace 20 años y fueron subsecuentemente identificados en células epiteliales, células del endotelio vascular, neuronas, células de músculo liso y cardíaco, fotorreceptores, linfocitos, hepatocitos y glándulas salivales.

En ovocitos de *Xenopus laevis* se expresan endogenamente corrientes de Cl⁻ activadas por Ca²⁺, las cuales son más evidentes cuando se produce un incremento en el Ca²⁺ intracelular del ovocito (17). A bajas concentraciones de calcio las curvas corriente-voltaje (I-V) muestran que el canal es un fuerte rectificador saliente, sin embargo a altas concentraciones de Ca²⁺ la curva I-V se vuelve lineal. Este cambio en las propiedades de rectificación con diferentes concentraciones de Ca²⁺ es consecuencia de la afinidad del canal por Ca²⁺ y su dependencia con el voltaje. Hay varios datos que sugieren que el cierre del canal es sensible a voltaje, pero la apertura del canal es dependiente de Ca²⁺. El mecanismo por el cual el Ca²⁺ activa al canal está sujeto a controversia y por el momento se asume que el canal se activa por una unión directa del Ca²⁺ al canal.

La distribución y homeostasis del Ca²⁺ en estas células se da de la siguiente manera: el Ca²⁺ entra a través de la membrana plasmática por la entrada capacitativa de Ca²⁺ (CCE). Los almacenes de Ca²⁺ se empiezan a agotar, entonces la membrana plasmática transporta Ca²⁺ por vía CCE se activa por un mecanismo que aun no se sabe. Una vez en el citosol el Ca²⁺ es secuestrado por el Retículo Endo/Sarcoplásmico (SER) por la bomba de Ca²⁺ (SERCA) la cual es bloqueada por Tapsigargin. Otra entrada de Ca²⁺ al citoplasma es a través del canal sensible a IP₃ en la membrana de SER. La salida de Ca²⁺ de los almacenes internos regulan primordialmente la corriente de Cl⁻ rápida mientras que la entrada de calcio por CCE controla la corriente lenta (Fig. 4).

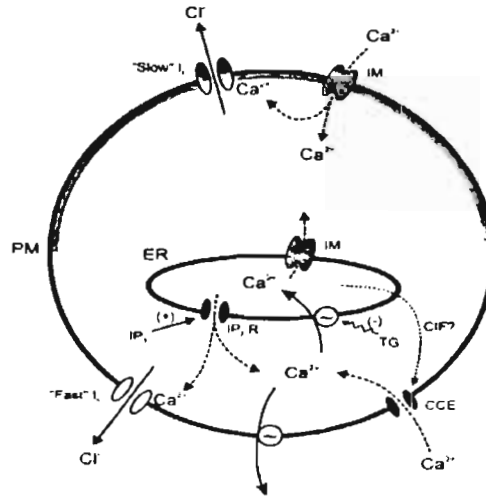


Figura 4. Modelo de la distribución y homeostasis de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*. SER-Reticulo Endoplásmico; PM-membrana plasmática; IM-ionomicina; IP3-inositol trifosfato; TG-tapsigargin; ATP-adenosin trifosfato; canal de cloruro dependiente de calcio rápido y lento (20).

Regulación de CaCCs

Estos canales son regulados por diversas señales (2).

- 1) Iones tales como aniones permeantes (tiocianato) y protones (pH). Los CaCC son sensibles a cambios en pH intracelular o extracelular. Por ejemplo, la acidificación intracelular inhibe el CaCC y aunque el mecanismo se desconoce se ha sugerido que los H^+ internos compiten por los sitio de unión de Ca^{2+} en el canal.
- 2) Proteínas:
 - CaMKII puede activar al CaCCs, por el contrario en músculo liso traqueal y arterial CaMKII inhibe al canal (2).
 - Fosfatasa, la fosfatasa alcalina al igual que la calcineurina actúan como reguladores positivos de CaCC (2).
 - Anexinas, inhiben al CaCC porque unen Ca^{+2} y se encuentran en la membrana apical del epitelio secretor (2).
 - Proteínas G, activan al CaCC porque inducen el vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{+2} (2).
 - Regulador Transmembranal de la Conductancia de Cloruro (CFTR). CaCC y CFTR colocalizan en la membrana apical de células epiteliales de pulmón y células acinares de la glándula salival (Fig. 5). CFTR inhibe al CaCC. Ambas corrientes de cloruro (CaCC y CFTR) no son aditivas (17, 22, 23).

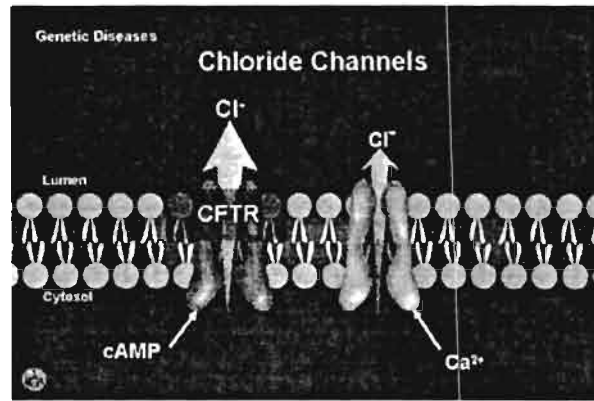


Figura 5.- Esta imagen demuestra dos clases de canales de cloruro. CFTR es activado por AMPc dependiente de proteína cinasa. El segundo de la familia de canales de cloruro es regulado por Ca²⁺, estos pueden estar presentes en algunas células, entre ellas, en células acinares.

Regulador Transmembranal de la Conductancia de Cloruro (CFTR). CFTR es un miembro de la familia de transportadores ABC. Es una molécula muy compleja que funciona como canal de Cl⁻ independiente de voltaje, además de actuar como un complejo regulador de otras proteínas asociadas a membranas. Así por ejemplo hay reportes que muestran que en glándulas salivales, endoteliales entre otras el CFTR inhibe a los CaCCs (4).

El CFTR se asocia además a Fibrosis Quística, la cual es una enfermedad caracterizada por una secreción de moco densa en vías aéreas pequeñas y ductos secretorios. Esta secreción causa infecciones, producidas frecuentemente con el 60%, por el microorganismo *Pseudomona aeruginosa*, también se presenta inflamación y una progresiva destrucción del pulmón y las glándulas secretorias. En el sudor de pacientes con Fibrosis Quística también se encuentra una alta concentración de sales como resultado de una defectiva absorción de Cl⁻ en las glándulas sudoríparas. La mayoría de los pacientes son diagnosticados mediante la prueba del sudor (98% de los pacientes tienen una concentración de Cl⁻ en el sudor superior a 61mEq/L o >60 mM) (6).

El gen del CFTR esta localizado en el cromosoma 7 (7q31) y esta constituido por 27 exones. Dicho gen codifica para una proteína de 1480 aminoácidos que tiene una masa molecular de 168 kDa. El producto de este gen se expresa en células epiteliales, principalmente de páncreas, glándulas salivales, pulmón, intestino, tracto reproductivo y tubulos renales. Se ha demostrado que CFTR se localiza en la membrana apical de dichas células, orientado hacia el lumen de los ductos o vías aéreas y también se ha encontrado en membranas intracelulares (5, 7, 13).

Características del CFTR. La activación del CFTR es independiente de voltaje, su conductancia unitaria es de aproximadamente 10 pS y muestra una selectividad 10-20 veces mayor para Cl⁻

que para Na^+ . La selectividad aniónica de este canal muestra la secuencia: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$. La activación del canal es dependiente de fosforilación por PKA y PKC (3). La apertura del canal requiere fosforilación del dominio Regulador por PKA y la subsecuente unión e hidrólisis de ATP a los dominios de unión al nucleótido (21).

Estructura del CFTR. La proteína CFTR tiene mitades homologas, cada una compuesta por seis dominios transmembranales y un largo lazo citoplásmico que contiene los llamados sitios de unión a nucleótidos (NBD), a los cuales se une el ATP. Entre estas dos mitades homologas se localiza el dominio regulador (R), el cual contiene múltiples sitios de fosforilación (5), (7) (Fig.6).

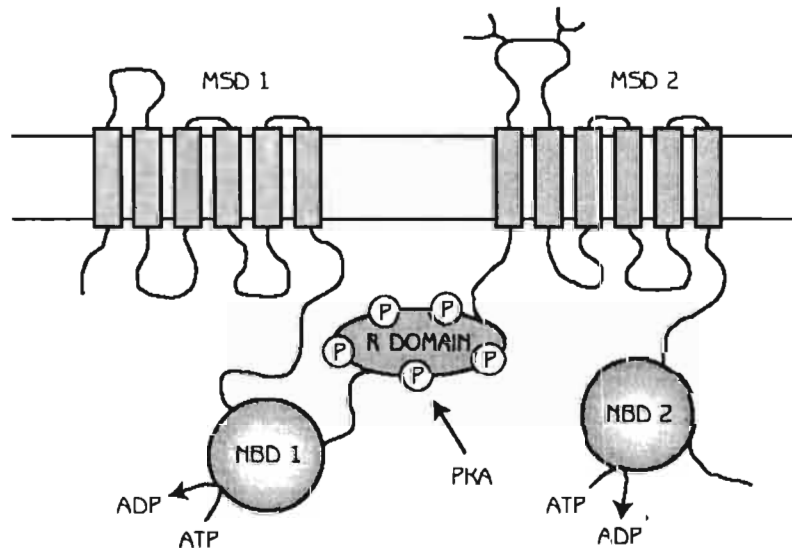


Figura 6. Estructura del canal CFTR. MSD1 (región transmembranal 1), MSD2 (región transmembranal 2), NBD1 (dominio de unión al nucleótido 1), NBD2 (dominio de unión al nucleótido 2), R (Dominio Regulador), P (fosfatos), ADP (Adenosin difosfato) y ATP (Adenosin Trifosfato).

El dominio R posee múltiples sitios de fosforilación para PKA y PKC, permite la unión e hidrólisis de ATP en los sitios "NBD" y cuando no se encuentra fosforilado puede inhibir al CFTR.

Como se menciona anteriormente este canal de cloruro también puede actuar como un regulador de otros canales iónicos como son el canal de sodio epitelial (ENaC), canales rectificadores salientes (OR), canales de potasio ROMK y algunos canales de agua (AQP3). La regulación de CFTR de los canales ORCC requieren que el dominio regulador del CFTR este intacto, indicando que la fosforilación del dominio regulador es importante para esta función (18).

Interacción entre CaCC y CFTR

La activación endógena de CaCC por ionomicina en ovocitos de *Xenopus* no es influenciada por AMPc. Sin embargo la estimulación de CaCC en ovocitos que coexpresan CFTR fue dependiente de la activación de CFTR por IBMX (inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas). La sobre-activación de CFTR disminuye la corriente producida por el canal CaCC. Los ovocitos también muestran que el incremento en el calcio intracelular provocado por la estimulación con ionomicina, es igual en ovocitos control y ovocitos que expresan CFTR después de que fueron estimulados con IBMX. Por lo tanto la activación de CFTR no tiene influencia sobre el transiente de Ca^{2+} provocado por ionomicina. Por lo tanto, en ovocitos de *Xenopus* la amplitud de las corrientes de cloruro debidas a los CaCCs es atenuada durante la activación del CFTR, lo que sugiere que CFTR de alguna manera controla la actividad de CaCCs (13). En células epiteliales de arteria pulmonar de bovino (CPAE) en cultivo, las corrientes de CaCC son significativamente reducidas en células CPAE transfectadas con la secuencia del CFTR. (23). Sin embargo, la activación de CFTR no es un prerrequisito para inhibir al CaCC pero al parecer puede potenciar dicho efecto inhibitorio.

En células acinares de ratón $CFTR^{-/-}$ la magnitud de la corriente CaCC fue aproximadamente 2 veces mayor que en las células silvestres. Las células silvestres en presencia de AMPc muestran una inhibición de la I_{CaCC} , pero casi se pierde esta inhibición, en células aisladas de ratón $CFTR^{-/-}$; lo cual sugiere que el AMPc es inhibidor de CaCC a través de CFTR (17) (Fig. 7).

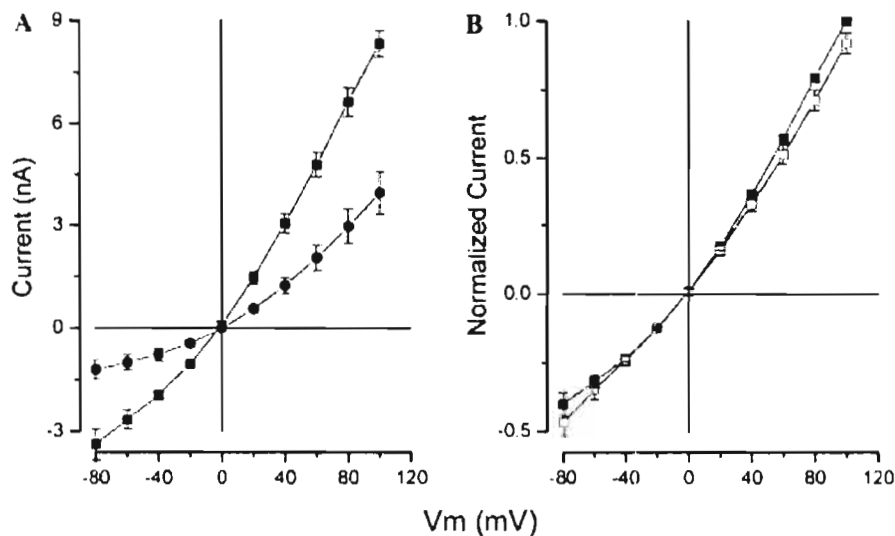


Figura 7. Regulación de la I_{CaCC} por CFTR. (A). Promedio de curvas I-V obtenidas de células acinares aisladas silvestres (circulo negro, n=7) y $CFTR^{-/-}$ (cuadro negro, n=4). (B). Curva I-V normalizadas obtenidas de células acinares $CFTR^{-/-}$ en ausencia (cuadro negro) y presencia (cuadro blanco) de 1mM CPT-cAMP (17).

CFTR tiene un dominio R que codifica para 50 aminoácidos localizado en la posición 780-830. Tiene tres sitios consenso para PKA. El dominio R de CFTR es importante para la modulación de la actividad de CaCC ya que cualquier delección en esta región resulta en pérdida casi completa de la actividad inhibitoria (14). Más aun, la región carboxi-terminal del dominio R de CFTR parece ser fundamental para esta inhibición ya que al quitarse también induce la pérdida de la inhibición de CaCC. Reemplazando esta región del dominio R con el dominio linker (dominio que da resistencia a multidrogas) de MDR1 se reestablece la actividad de CFTR pero no la inhibición sobre CaCC (23). Estos datos sugieren que la parte carboxi-terminal del dominio R es responsable de la inhibición al CaCC por CFTR (Fig. 8) (13, 23).

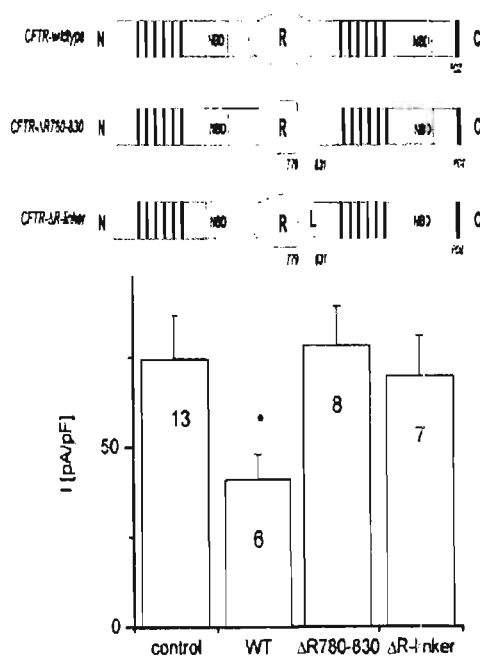


Figura 8. Comparación de I_{CaCC} con diferentes constructos de CFTR. Activación de CaCC por $1\mu\text{M}$ de ATP a $+50\text{ mV}$, controles y constructor expresados en células epiteliales de la arteria pulmonar de bovino (CPAE). El número de células parchadas se indica en las barras. $\Delta\text{R}780\text{-}830$ (quitan la región carboxi-terminal del dominio R), $\Delta\text{R-linker}$ (desplazan la región carboxi terminal del dominio R por un linker de MDR1 que da resistencia a multidrogas) (23).

Mecanismo de inhibición de CaCC por CFTR.

La interacción entre CFTR y CaCC podría darse mediante cuatro distintos mecanismos:

1. El CFTR podría actuar directamente sobre el CaCC mediante una interacción proteína-proteína.
2. La interacción entre ambos canales podría darse a través de una tercera proteína.
3. El CFTR podría mediar el transporte de cloruro y así regular al CaCC.
4. El CFTR podría influenciar la inserción del CaCC en la membrana

La interacción canal-canal ya ha sido observada entre receptores D5 y canales activados por γ -amino-acido butírico (GABA) y entre receptores nicotínico y receptores purinérgicos del tipo P2X. Así pues, bajo condiciones donde la función del CFTR fuera defectuosa la interacción CFTR-CaCC produciría una sobre activación del CaCC preservando así la función secretora normal. Por lo tanto la región carboxi-terminal del dominio R, es importante no solo para regular la activación dependiente de fosforilación del canal CFTR, sino que también podría estar involucrada en la inhibición del CaCC (4).

El canal CFTR ejerce un efecto regulador sobre varios canales iónicos. El modo preciso de la interacción entre CFTR y CaCC no es claro. Por lo tanto es importante precisar el tipo de interacción que se da entre estas proteínas.

El saber los posibles sitios de interacción entre CFTR y CaCC podría ayudar a entender esta función reguladora de CFTR y proveer una llave para inducir una sobre regulación de CaCC bajo condiciones defectuosa de la función de CFTR. Sin embargo este paso claramente demanda la identificación molecular de CaCC la cual todavía no se conoce. La identificación de los sitios podría ayudar a explicar algunas paradojas entre el genotipo y fenotipo de CFTR. Además se sabe que los elementos estructurales que afectan CFTR y la actividad de CaCC por la interacción canal-canal podría también ser usado para identificar nuevos y específicos blancos para la terapia de Fibrosis Quística. La importancia funcional de la interacción entre estos canales podría ser que cuando ocurre una expresión defectuosa de CFTR se produzca una sobre regulación de los canales CaCCs, los cuales están potencialmente disponibles para producir el transporte de cloruro en lugar de CFTR.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El CFTR a través de la región carboxi-terminal del dominio regulador modula los canales de cloruro activados por calcio de manera directa, mediante una interacción proteína-proteína.

Objetivo General

Determinar si la actividad del CaCC es regulada por un péptido de 50 aminoácidos derivado del dominio regulador del CFTR (50RC).

Objetivos específicos

1. Obtener a partir de la secuencia del gen CFTR de humano (hCFTR) el fragmento de DNA que codifica para la región carboxi-terminal del dominio regulador
2. Sintetizar *in vitro* el péptido regulador (50RC) correspondiente
3. Sintetizar *in vitro* el mRNA que codifica para la región carboxi-terminal del dominio regulador
4. Evaluar el efecto inhibitor del péptido 50RC sobre las corrientes CaCC endógenas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

METODOLOGIA

1. Obtención de la secuencia que codifica para la región carboxi-terminal del dominio regulador

El gen CFTR de humano, regalo del laboratorio del Dr. James Melvin, fue usado como DNA patrón para obtener por PCR la región carboxi-terminal del dominio regulador. Este DNA estaba inicialmente clonado en un vector biscistrónico PIRES-2 que contiene tanto el DNA phCFTR como la proteína verde reportera EGFP.

1.1 Amplificación del DNA patrón phCFTR-EGFP-N1.

Para amplificar el DNA patrón se transformaron bacterias competentes *E. coli* cepa TOP10 (Invitrogen) con 500 ng/ μ l del plasmido phCFTR-EGFP-N1. Para los controles positivos se utilizó el DNA del plasmido pUC19. Posteriormente el DNA plasmídico se extrajo de las células transformadas utilizando el sistema Midiprep (Qiagen) y se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0%.

1.1.1 Transformación de bacterias competentes E. coli TOP10.

A un vial con 50 μ l de células TOP10 químicamente competentes se les agregó 2 μ l (500 ng) de DNA patrón. Para la transformación con pUC19 se utilizaron 50 μ l de células y 1 μ l de DNA. Ambas reacciones se incubaron en hielo por 30 min., después se incubaron a 42°C por 30s para producir un choque térmico. La mezcla de transformación se colocó en hielo por 2 min. y posteriormente se agregaron 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente y la mezcla se incubó en posición horizontal por 90 min a 37°C con agitación (225 rpm). Se tomaron alícuotas de 25-100 μ l de la reacción de transformación para inocular placas de agar LB (Lennox L agar, Sigma) suplementado con 100 μ g/ml de Ampicilina. Las placas de agar se incubaron a 37°C por 20 h.

1.1.2 Extracción del DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de las células que mostraron resistencia a ampicilina se extrajo utilizando un producto comercial para purificación de DNA (QIAGEN Plasmid Midi Kit). La purificación por el procedimiento de Qiagen es un procedimiento modificado de lisis alcalina, en el cual se aísla el plasmido de los contenidos celulares por medio de una resina de intercambio bajo condiciones de pH apropiadas. Las impurezas, proteínas y RNA son removidas mediante varios lavados, mientras que el DNA del plasmido es eluido con un amortiguador alto en sales y después concentrado y desalado por precipitación con isopropanol.

En estos experimentos primero se tomo una colonia resistente a ampicilina y se inoculo en 5 ml de medio LB (Lenox L Broth Base, Gibco BRL) con 100 µg/ml ampicilina. El cultivo se incubo durante 16 horas a 37 °C (300 rpm). Para aislar el DNA primero se retiro el medio de cultivo centrifugando a 4,500 rpm durante 25 min., a una temperatura de 4°C. La pastilla de células se resuspendió en 10 ml de amortiguador P1, luego se agregaron 10 ml de amortiguador P2 y se incubo por 5 min. Después se agregaron 10 ml de amortiguador P3, se mezclo por inversión y se incubo en hielo durante 20 min. Finalmente se centrifugo a 4°C por 40 min. (12,000 rpm) para separar el sobrenadante que contenía el DNA del plasmido.

Las columnas de separación del DNA se equilibraron primero con 10 ml de amortiguador QBT y luego se aplico el sobrenadante para permitir la unión del DNA a la columna. Posteriormente se realizaron dos lavados con 30 ml de amortiguador QC. Finalmente el DNA se eluyó con 15 ml de amortiguador QF. Para concentrar el DNA obtenido, este se precipito usando 10.5 ml de isopropanol y centrifugando a 4°C durante 30 min. a 11,000 rpm. El sobrenadante se descarto y la pastilla de DNA se lavo con 5 ml de etanol al 70% para después volver a centrifugar a 11,000 rpm durante 20 min. Una vez seca la pastilla (se dejo airar durante 8 min. en campana de flujo laminar), el DNA se redisolvió en un volumen pequeño de amortiguador (TE, PH 8.0).

1.1.3 Linearización del DNA.

Una vez limpio el DNA se linearizó mediante una reacción de digestión con la enzima de restricción NotI (Tabla 1). Para ello se incubaron 7 µg de DNA con 7.5 unidades de la enzima durante toda la noche a una temperatura de 37°C. Al término de la reacción la enzima se inactivo por calor incubándola a 65°C durante 20 min. (Fig.15).

Enzima	Sitio de reconocimiento
NotI	5'-GC GGCC GC-3' ----- 3'-CG CCGG CG-5'

Tabla 1. Sitio de reconocimiento de NotI.

1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para amplificar la región carboxi-terminal del dominio R se utilizo PCR. Para esta técnica se diseñaron oligonucleótidos específicos con ayuda del programa Vector NT1 de Invitrogen (Tabla 2). Con la técnica de PCR se puede obtener *in vitro* un gran número de copias a partir de un fragmento de DNA particular. Esta técnica se basa en la actividad de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplean ciclos donde se alternan temperaturas altas y bajas. El procedimiento consta de la repetición cíclica de tres etapas:

- 1) Desnaturalización: las dos hebras de las cuales está constituido el DNA se separan a 94°C.
- 2) Hibridización: unión del oligonucleótido a su secuencia complementaria en el DNA patrón, para esto es necesario reducir la temperatura a 55°C. Los oligonucleótidos se unen a los extremos de la región que va a ser amplificada. La temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos depende de la composición de las bases y del tamaño de los oligonucleótidos. La selección de los oligonucleótidos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del proceso de PCR.
- 3) Extensión: la DNA polimerasa actúa tomando el DNA patrón para sintetizar la cadena complementaria, partiendo del oligonucleótido cebador como paso inicial necesario para la síntesis del nuevo DNA. Con este fin se aumenta la temperatura hasta 72°C, ya que a esta temperatura la DNA polimerasa presenta su máxima actividad.

El ciclo (desnaturalización-hibridización-extensión) descrito se repite un número finito de veces dependiendo de la cantidad de producto amplificado que se desea obtener. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de DNA delimitada por la secuencia de los oligonucleótidos específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los siguientes ciclos, la cantidad de DNA incrementa exponencialmente. De este modo al final de *n* ciclos el número de copias de DNA por cada molécula será de 2^{*n*}.

El experimento de PCR se llevo a cabo como se describe a continuación. La secuencia que se copio del gen hCFTR consta de 150 pares de bases y codifica para un péptido de 50 aminoácidos. Tanto la secuencia del DNA como la del péptido se muestran a continuación:

5'	CAGAACATTC	ACCGAAAGAC	AACAGCATCC	ACACGAAAAG
	TGTCAGTGGC	CCTCAGGCAA	ACTTGACTGA	ACTGGATATA
	TATTCAAGAA	GGTTATCTCA	AGAAACTGGC	TTGGAATAA
	GTGAAGAAAT	TAACGAAGAA	GACTTAAAGA	3'.

QNIHRKTTAS TRKVSLAPQA NLTELDIYSR RLSQETGLEI SEEINEEDLK

Los oligonucleótidos sintetizados comercialmente por SIGMA que se usaron para esta reacción se muestran a continuación:

Oligonucleótidos	Producto	Temperatura de Alineamiento (°C)	%GC
Sentido 5'-CAGAACATTCACCGAAAGAC-3'		59.7	45
Antisentido 5'-CTCCTTTAAGTCTTCTCGT-3'	150 pb	58.5	40

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados con el programa Vector NT1.

Los reactivos y concentraciones utilizadas para la reacción de PCR fueron los siguientes:

Reactivos (stock)	Volumen (µl)	Concentración (final)
Taq polimerasa (5U/µL), Invitrogen	0.1	2.5 U
Amortiguador de PCR 10X, Invitrogen	2	1 X
dNTPs (10 mM), Invitrogen	0.4	0.2 mM
MgCl ₂ (50 mM), Invitrogen	0.6	1.5 mM
Oligonucleótidos (10 nM), Sigma-Genosis	3	50 ng
DNA hCFTR (50 ng)	2	100 ng
H ₂ O	llevar a 20	

Tabla 3. Condiciones para la reacción de PCR.

Los ciclos de tiempo/temperatura utilizados se programaron en un Termociclador modelo Gene Cycler de BioRad. Aquí se muestran a continuación:

No. de Ciclos	Temperatura/Tiempo
1 Ciclo	94°C/2 min.
35 Ciclos	94°C/1 min.
	55°C/1 min.
	72°C/1 min.
1 Ciclo	72°C/30 min.

Tabla. 4. Temperaturas del proceso de PCR.

Al final de la reacción el producto de PCR se visualizó mediante un gel de agarosa al 15%, el cual se tiñó con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 100 pb (Biolabs).

1.2.1 Análisis del resultado de PCR. Electroforesis en geles de agarosa.

La migración de los ácidos nucleicos a través del gel de agarosa varía, entre otros factores, en función de su peso molecular, conformación, gradiente de voltaje y concentración de agarosa en el gel. La siguiente tabla muestra la eficiencia de separación de geles que contienen distintos porcentajes de agarosa. Esta tabla fue usada como referencia para preparar los geles utilizados en nuestros experimentos.

% de Agarosa en el gel	Eficiencia de separación en gel (kb)
0.6	1-20.0
0.7	0.8-10.0
0.9	0.5-7.0
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

Tabla 5. Eficiencia de separación de separación en diferentes porcentajes de agarosa.

1.2.2 Preparación de geles de agarosa.

Amortiguador	Composición
TAE 1X	40mM de Tris, pH 7.6 20mM de Acido Acético 1mM de EDTA
Amortiguador de Carga	60 mM Tris-HCl, pH 7.5 60 mM EDTA, pH 8.0 0.36 % Xylene Cyanol FF 2.4 % Naranga G 30 % Glicerol
Bromuro de Etidio	10 mg Bromuro de Etidio 1 ml de agua

Tabla 6. Soluciones utilizadas en electroforesis con geles de agarosa

Los ingredientes mostrados en la tabla anterior se usaron en la preparación de geles. Brevemente, se disolvieron 0.45g de agarosa en 30 ml de amortiguador TAE 1X usando un horno de microondas y luego se añadió un 1 μ l de Bromuro de Etidio (10mg/ml) (agente fluorescente que se intercala entre cada 2.5 pares de bases nitrogenadas, independientemente de que base sea y se visualiza al estimular con luz UV de 302-366 nm). La solución se vierte en una cubeta de electroforesis en la que se coloca un peine para formar los posillos donde se aplicaron las muestras. Una vez polimerizado el gel se retiro el peine y se sumergió el gel en la cámara de electroforesis que contenía solución amortiguadora TAE 1X. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron utilizando un voltaje de 70 mV. El gel se dejo correr hasta que el frente del colorante que contenía el amortiguador de carga (el cual migra mas rápido que la muestra) alcanzo el extremo del gel. Las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se

comprobó que el fragmento amplificado por PCR aparecía en el gel con el tamaño esperado y a una concentración adecuada. Se comprobó también que el control negativo no contenía ninguna amplificación (lo cual indicaría contaminación en el proceso). El gel se visualizó con un transiluminador usando una longitud de onda de 302 nm y el resultado se registró fotografiando el gel con una cámara (tiene un filtro especial para luz UV) que permite fotografiar geles teñidos con Bromuro de Etidio.

1.3 Clonación del fragmento de PCR.

La secuencia de interés que fue previamente amplificada por PCR se clonó dentro del vector pEXP5-NT/TOPO usando la tecnología TOPO TA (Invitrogen).

El vector pEXP5-NT/TOPO usado contiene un promotor para la polimerasa T7, un sitio de unión al ribosoma, un codón de inicio, una secuencia que codifica para seis histidinas, un sitio de corte que reconoce la parte N-terminal de la proteína de fusión llamado TEV, un lugar para insertar la secuencia de interés (producto de PCR) y un sitio de terminación de la transcripción. El vector posee además un gen de resistencia a ampicilina (Fig. 9).

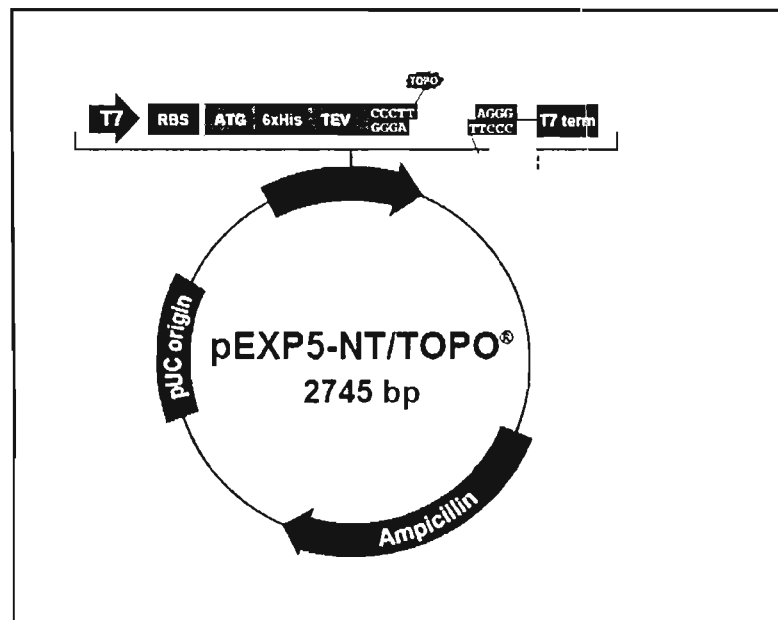


Figura 9. Representación esquemática del vector pEXP5-NT/TOPO

El protocolo de clonación que se utilizó consiste de 3 pasos:

- Amplificación del producto de PCR
- Reacción de ligación entre el producto de PCR y el vector pEXP5-NT/TOPO
- Transformación de células mach1 T1 *E. coli* competentes (Fig. 10)

Durante el periodo de incubación se llevo a cabo la ligación del producto de PCR con el vector mediante acción de la enzima topoisomerasa I, la cual se localiza covalentemente unida a la secuencia CCCTT del vector pEXP5-NT/TOPO. En este sistema la energía de ruptura del enlace fosfodiéster es conservada para formar un enlace covalente entre el fosfato 3' y el residuo tirosil (Tyr-274) de la topoisomerasa I. El enlace fosfo-tirosil formado entre el DNA y la enzima puede ser subsecuentemente atacado por el grupo hidroxilo 5' de la secuencia de interés, liberando así a la topoisomerasa I y dejando unida al vector la secuencia de interés. El fragmento de PCR posee residuos de adenina en un extremo, lo cual mejora la eficiencia de unión entre el producto de PCR y el vector además de que previene la recircularización del vector.

1.3.1 Ligación entre el producto de PCR y el vector pEXP5-NT/TOPO.

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR fresco	1
Solución de Sales	1
Agua	3
Vector pEXP5-NT/TOPO	1
Volumen Final	6

Tabla 7. Mezcla para ligar el producto de PCR con el vector pEXP5-NT/TOPO

En la tabla 7 se muestran los reactivos que se utilizaron en la mezcla para la reacción de ligación. Esta reacción se incubo por 5 min. a temperatura ambiente (22-23°C) y luego en hielo para detener la reacción. Enseguida se propago el DNA ya ligado siguiendo el protocolo ilustrado en la Figura 10.

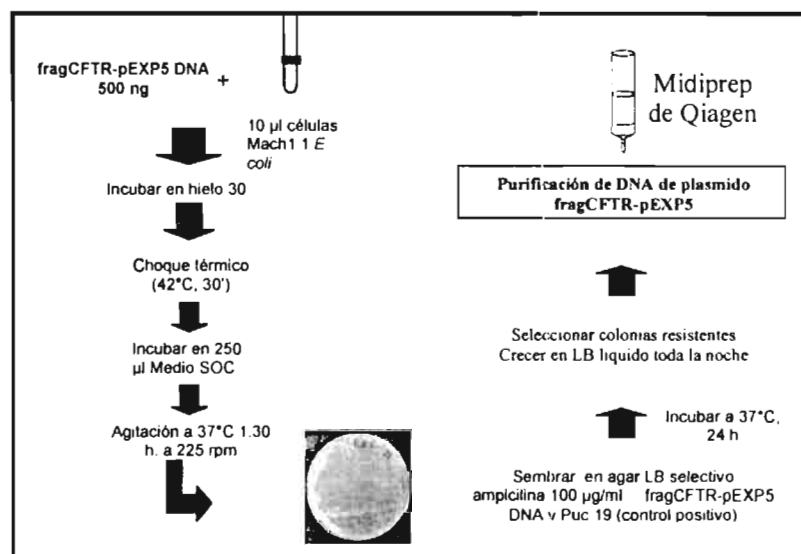


Figura 10. Transformación de células TOP10 *E. coli* y purificación del plásmido (fragCFTR-pEXP5).

1.3.2 Purificación del DNA plasmidico.

La purificación del plasmido se inicio con la inoculación de una colonia de *E. coli* previamente transformada con el DNA del constructo fragCFTR-pEXP5 en 10 ml de medio LB. El cultivo se incubo a 37°C durante 16 horas. A continuación se purifico el DNA plasmidico utilizando el Kit de QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Los 10 ml de medio LB que contenían la colonia transformada se centrifugaron a 4500 rpm por 15 min. a una temperatura de 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 450 µl de amortiguador P1 y se transfirió a un tubo de centrifuga. A continuación se añadieron 450 µl de amortiguador P2 y se invirtió el tubo de 5 veces para mezclar el contenido. Finalmente se añadieron 650 µl de amortiguador N3, se mezclo todo invirtiendo cuidadosamente el tubo 5 veces. La mezcla se centrifugo a 13000 rpm por 10 min., el sobrenadante se transfirió a una columna (Qiaprep) y se centrifugo de nuevo a 4000 rpm durante 1 min. Una vez descartado el líquido, se añadió a la columna 0.5 ml de amortiguador PB y se centrifugo de nuevo a 4000 rpm por 1 min. Posteriormente la columna de purificación se lavo con 0.75 ml de amortiguador PE el cual se deja incubo primero por 4 min. a temperatura ambiente y luego se centrifugo a 4000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se descarto y se volvió a centrifugar a 12,420 rpm durante 1 min. Finalmente la columna se paso a un tubo limpio y el DNA se eluyó con 25 µl de amortiguador EB, centrifugando durante 1 min. a 12,420 rpm.

1.3.3 Determinación de la concentración de DNA.

La concentración del DNA se determino usando un espectrofotómetro de luz UV (Biorad). Para ello se tomo una alícuota de DNA y se midió la absorbancia a 260 nm, tomando en cuenta que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda equivale a 50 µg/ml para un DNA de doble cadena. Dado que el pico máximo de absorción se da a 280nm, se calculo el cociente A260/A280 para descartar contaminación por proteínas y determinar la pureza de la muestra. Cocientes entre 1.8-2.0 indican un elevado grado de pureza del DNA.

1.3.4 Digestión enzimática de fragCFTR-pEXP5.

Dado que el fragmento de 150 pb se clono de manera no direccional en el vector se procedió a realizar un análisis de restricción de las colonias obtenidas. Con este fin el DNA se linearizó mediante una reacción de digestión con las enzimas RsaI y Bsu361 (Tabla 8). Para la reacción se utilizo 1 µg de DNA, el cual se incubo con 5 unidades de la enzima Bsu361, 10 unidades de la enzima RsaI, el amortiguador NE3 1X y 100 µg/ml de BSA, por un periodo de 1 hora y 42

minutos a una temperatura de 37°C. Al término de la reacción las enzimas se inactivaron por calor, incubando la mezcla durante 20 min. a una temperatura de 80 °C.

Enzima	Sitio de reconocimiento
BSU36I	5'-CC TNAGG-3' ----- 3'-GGANT CC-5'
RsaI	5'-G AC-3' ---- 3'-CA TG-5'

Tabla 8. Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción BSU36I y RsaI.

2. Síntesis *in vitro* del péptido regulador 50RC.

2.1 Transcripción y Traducción *in Vitro*.

El plasmido recombinante fragCFTR-pEXP5 se utilizó para sintetizar *in vitro* el péptido 50RC utilizando el sistema Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System (Invitrogen). En la figura 11 se ilustra como se lleva a cabo la transcripción y traducción *in Vitro* de una secuencia de interés para producir una proteína recombinante que contiene una marca de 6 residuos de histidina.

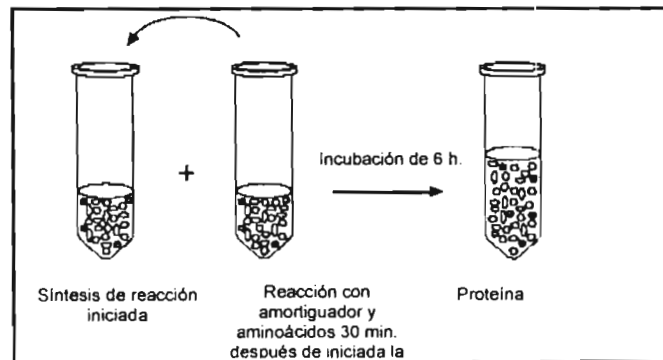


Figura 11. Sistema Expressway Cell Free *E. coli* Systems utilizado en la producción de proteínas recombinantes.

Para el experimento se utilizó 1 µg de DNA por cada 100 µl de reacción. Este sistema utiliza un extracto de *E. coli* optimizado, un amortiguador que contiene un sistema de regeneración de ATP, y aminoácidos que permiten altos niveles de síntesis de la proteína recombinante. En la

mezcla de reacción se añadió el extracto de *E. coli slyD*, un amortiguador sin aminoácidos 2.5X IVPS, aminoácidos varios (1.25 mM), la polimerasa T7, el DNA del constructo fragCFTR-pEXP5 y/o el control positivo pEXP5-NT/CALM3, además de agua. Posteriormente la mezcla se incubo durante 30 min. y al finalizar este tiempo se le agregó un amortiguador con sales, aminoácidos y sustratos adicionales para continuar la reacción. El volumen final de la reacción fue de 100 μ l. Como producto de esta reacción se obtuvo un péptido recombinante formado por el péptido 50RC y una región de seis histidinas. Este péptido de fusión se detecto por Western Blot utilizando un anticuerpo comercial Anti-His6. Finalmente, el péptido se purifico por medio de un sistema con columnas de afinidad.

2.1.1 Síntesis de proteína 50RC.

Para cada muestra se incubaron los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad
Extracto de <i>E. coli SlyD</i>	20 μ l
2.5x IVPS <i>E. coli</i> Amortiguador de reacción	20 μ l
50 mM Aminoácidos (-Met)	1.25 μ l
75 mM Metionina	1.0 μ l
T7 Mezcla de enzima	1.0 μ l
Templado de DNA	1.0 μ g/ μ l
Agua libre de DNasa y RNasa	5.75 μ l

Tabla 9. Mezcla de reacción para la síntesis del péptido 50RC

Se mezcla la reacción a fondo, se lleva a un incubador vibratorio estandar a 300 rpm por 30 min. a 30°C. Se realiza la siguiente reacción para cada muestra:

Reactivos	Cantidad
2X IVPS Amortiguador Feed	25 μ l
50 mM Aminoácidos (-Met)	1.25 μ l
75 mM Metionina	1.0 μ l
Agua libre de DNasa y RNasa	22.75 μ l

Tabla 10. Ingredientes adicionales para la reacción de síntesis del péptido 50RC

Pasados 30 min. de incubación se agregaron 50 μ l de la mezcla de reacción mostrada en la tabla 10, la cual contiene mas aminoácidos y amortiguadores para la síntesis de proteína. Esta segunda reacción se incubo con agitación (300 rpm; incubadora Barnstead Lab-line) durante un

periodo de 6 horas a una temperatura de 30°C. El producto de la reacción se almacena a -20°C para su posterior purificación y análisis con Western blot.

2.1.2 Precipitación de proteínas con Acetona

Una vez terminada la síntesis del péptido, se añadió en un tubo compatible con acetona 10 µl de la mezcla de reacción de síntesis de proteína y 40 µl de Acetona. Todo se incubó a -20°C durante 1 hora y al término de la incubación se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó sin perturbar la pastilla de proteínas y la acetona se evaporó durante 15 min. Finalmente al tubo se le añadió suficiente amortiguador para disolver y resuspender la pastilla.

2.1.3 Electroforesis de Proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida

Las proteínas así solubilizadas se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliácridamida (SDS-PAGE). El método utilizado fue el método de Laemmli (1970), el cual se basa en la utilización de dos geles, un gel concentrador en la parte superior y un gel separador en la parte inferior. Los dos geles presentan diferentes características de porosidad, fuerza iónica y pH. Esta discontinuidad permite la reducción del volumen de las muestras, por lo tanto favorece en el gel separador la resolución de cada banda según su peso molecular.

2.2.1 Western Blot

Soluciones preparadas:

Solución	Composición	Cantidad
Amortiguador 1X SDS-PAGE	0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
	Glicerol (Invitrogen)	1.0 ml
	B-mercaptoetanol (Sigma)	0.2 ml
	Azul de Bromofenol (Fisher Scientific)	0.01 g
	SDS	0.20 g
	dH ₂ O	8.775 ml
Amortiguador de electroforesis	Tris-HCl (MP Biomedicals)	9.0 g
	Glicina (MP Biomedicals)	43.2 g
	SDS (Invitrogen)	3.0 g
	dH ₂ O	600 ml

Persulfato amónico (APS)	APS	0.1 g
	dH ₂ O	1.0 ml
Dodecil Sulfato de Sodio	SDS	1.0 g
	dH ₂ O	10 ml

Tabla 11. Soluciones utilizadas en los experimentos de Western blot

Para los experimentos de Western blot se utilizó el sistema (Biorad) para geles de 7 x 8 cm. Los geles preparados tenían una concentración de poliacrilamida de 18 %, los cuales se prepararon utilizando los siguientes componentes:

Componente	Gel concentrador	Gel separador
dH ₂ O	3.05 ml	0.650 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	-----	1.3 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.3 ml	-----
10% SDS	50 µl	50 µl
Acrilamida-Bis	0.650 ml	3.0 ml
10% APS (0.1 g/ml)	25 µl	50 µl
Temed	5 µl	0.5 µl

Tabla 12. Componentes de gel SDS-Poliacrilamida.

Para la preparación de estos geles es importante tener en cuenta que los catalizadores de la polimerización se agregan al final (Persulfato amónico y Temed). Los distintos componentes de la reacción se mezclaron y aplicaron a las placas de vidrio previamente limpiadas con etanol y una solución de 0.1% de SDS y montadas en la cámara de electroforesis. Una vez que se vació la mezcla del gel, este se cubrió inmediatamente con agua destilada para evitar el contacto con el aire y se dejó polimerizar durante 40 min. Una vez polimerizado el gel, se retiró el agua y se añadió la mezcla del gel concentrador, se colocó el peine y se dejó polimerizar durante otros 30 min. Las muestras ya precipitadas con acetona se resuspendieron en un amortiguador de carga 1X y se sometieron a un tratamiento desnaturador hirviéndolas durante 15 min. Una vez terminado el gel se agregó el amortiguador a la cámara y se colocaron las muestras en los posillos. Como marcador de peso molecular se utilizó Mark12 el cual es un marcador estándar sin tinte (Invitrogen). Los electrodos se conectaron a una fuente continua, la cual se mantuvo a 90 volts (55 mAmp) durante 20 min. Al cabo de este tiempo se cambió el voltaje a 120 V (67 mAmp) durante 40 min. o hasta que el frente de colorante se empezó a salir del gel. Una vez finalizada la electroforesis se preparó el gel para transferirlo o tinte ya sea con Azul de Coomassie o con Nitrato de Plata.

2.2.2 Tinción con Azul brillante de Comassie

Una vez finalizada la electroforesis el gel de SDS-Poliacrilamida se tiñó con una solución de Comassie G-250 (Bio-Rad) durante 12 horas y al término de la tinción se destiñó el gel usando agua destilada.

2.2.3 Tinción con Nitrato de Plata

Soluciones preparadas:

Solución	Composición	Cantidad
Solución de Fijación	Metanol	15 ml
	Ac. Acético	3.6 ml
	Formaldehído	15 μ l
	dH ₂ O	Llevar a 30 ml
Solución de Lavado (Metanol al 40%)	Metanol	24.0 ml
	dH ₂ O	36.0 ml
Solución de pretratamiento	Na ₂ S ₂ O ₃ 5H ₂ O	0.006 g
	dH ₂ O	30 ml
Solución de teñido	AgNO ₃	0.06 g
	Formaldehído	22.5 μ l
	dH ₂ O	29.977 ml
Solución de revelado	Na ₂ CO ₃	1.8 g
	Formaldehído	15 μ l
	Tiosulfato de sodio	600 μ l
	dH ₂ O	29.385 ml
Solución de Paro de Tinción	Metanol	15 ml
	Ac. Acético	3.6 ml
	dH ₂ O	11.4 ml
Solución de Lavado-almacenamiento	Metanol	15 ml
	dH ₂ O	15 ml

Tabla 13. Soluciones utilizadas para realizar tinción con Nitrato de Plata

Una vez separadas las proteínas en el gel de SDS-Poliacrilamida, el gel se incubó con agitación suave en la solución de fijación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 20 min. cada uno utilizando la solución de lavado. Luego el gel se colocó durante 1 min. en la solución de pretratamiento (en oscuridad). Posteriormente se realizaron 3 lavados

de 20 segundos cada uno usando agua destilada. Después el gel se colocó en la solución de tinción durante 20 minutos con agitación y en la oscuridad. Se realizaron 2 lavados de 20 segundos cada uno con agua destilada. Se añadió la solución de revelado y se incubó con agitación hasta que aparecieron las bandas. Se realizó un último lavado con agua destilada durante 20 segundos y finalmente se añadió la solución de paro durante 10 min. con agitación. Finalmente el gel fue colocado en la solución de lavado-almacenamiento.

2.2.4 Transferencia

Para realizar la transferencia de las proteínas el gel se transfirió a un soporte sólido, en este caso una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.2 μm (Biorad). La transferencia se realizó en tanque utilizando el sistema de Biorad.

Amortiguador	Composición	Cantidad
Amortiguador de Transferencia	Tris	3.03 g
	Glicina	14.4 g
	dH ₂ O	1 L

Tabla 14. Composición del Amortiguador de Transferencia

La membrana de PVDF utilizada se cortó para igualar el tamaño del gel, después se humedeció en metanol al 100% durante 15 segundos y posteriormente se lavó con agua bidestilada durante 2 minutos, siempre tomando el cuidado de que ninguna parte del filtro quedara seca. Finalmente la membrana se dejó 5 minutos en el amortiguador de transferencia formando un "sándwich".

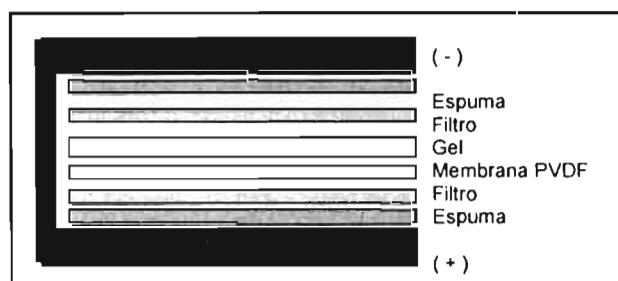


Figura 12. Representación de las capas de material ("sandwich") usadas para la transferencia de proteínas del gel a la membrana de PVDF

El "sandwich" formado se montó en la cámara de transferencia y el aparato se conectó a una fuente de corriente a 44 V (90 mA) durante 1 hora. Finalizada la transferencia el equipo se desmontó y la membrana de PVDF se reservó para los siguientes tratamientos.

2.2.5 Inmunoblot

Soluciones utilizadas:

Solución	Composición	Cantidad
Amortiguador salino de Tris (TBS)	Tris-HCl 1M	12.5 ml
	dH ₂ O	487.5 ml
Amortiguador salino de Tris + Tween 20 (TBST)	Tris-HCl 1M	12.5 ml
	Tween 20	0.5 ml
	dH ₂ O	487.0 ml
Amortiguador de bloqueo	TBS	20 ml
	Leche ligera	1.0 g
Amortiguador de dilución	TBST	10 ml
Fosfato de bromocloroindolyl (BCIP) 50 mg/ml	BCIP	0.050 g
	Dimetilformamida	1.0 ml
Nitro azul de tetrazolio (NBT) 50 mg/ml	NBT	0.050 mg
	Dimetilformamida	0.700 ml
	dH ₂ O	0.300 ml
Amortiguador de Fosfatasa alcalina	Tris-HCl	2.42 g
	NaCl	1.17 g
	MgCl ₂	0.0952 g
	dH ₂ O	200.0 ml

Tabla 15. Soluciones utilizadas para la técnica de Inmunoblot.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, ésta se incubo en 10 ml de solución de bloqueo al 5% con agitación suave durante 1 hora. Se membrana se lavo 3 veces 10 ml de TBST durante 5 min., usando agitación suave. Después la membrana se incubo a 4°C durante 16 horas usando 9.6 µl de la solución que contenía un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (1:2000), previamente diluido en 10 ml de amortiguador de dilución (dilución 1: 2.500.000). Al término de esta incubación se lavo 3 veces la membrana con 10 ml de TBST durante 5 min., usando agitación suave. Finalmente se procedió a detectar la señal usando el ensayo con fosfatasa alcalina.

2.2.6 Detección con Fosfatasa Alcalina

Para remover el detergente se lavo la membrana con 10 ml de TBS durante 5 min. usando agitación suave. Mientras tanto el sustrato para fosfatasa alcalina se preparo mezclando: 66 µl de NBT en 10 ml del amortiguador de fosfatasa alcalina y agregando después 33 µl de BCIP. La membrana se lavo de nuevo dos veces usando 10 ml del amortiguador de fosfatasa alcalina y después se agrego la solución de sustratos. Esta mezcla se incubo con agitación suave a

temperatura ambiente hasta que se observo desarrollo de color y luego se lavo con 10 ml de agua destilada durante 10 min.

2.3 Purificación del péptido de interés

Para purificar nuestro péptido se escogió el sistema comercial de ProBond Purification System (Invitrogen), el cual se basa en el uso de columnas de propileno cargadas con agarosa y Níquel. Por estas columnas se hace pasar el producto de reacción obtenido con el sistema Expressway Cell Free *E. coli* Systems. Una vez cargadas las columnas se incubaron un determinado tiempo, se lavaron y finalmente se eluyeron usando una solución de imidazol (Fig. 13). El imidazol es un intermediario en la biosíntesis de histidina que se forma a partir de imidazol glicerol fosfato con la pérdida de agua. Este compuesto puede coordinar metales pesados a través de los átomos de nitrógeno piridinico o pirrólico con los cuales forman puentes de hidrogeno. Dentro de la columna el imidazol se une a los átomos de Níquel y desplaza a la proteína unida permitiendo así recuperar la proteína de fusión. Posteriormente el péptido purificado se visualiza por medio de electroforesis con geles SDS-PAGE, los cuales se tiñen con Nitrato de Plata.

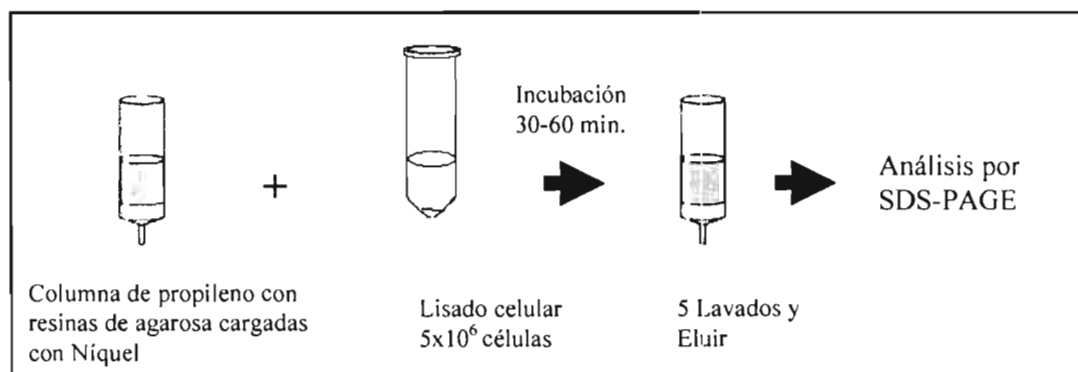


Figura. 13. Esquema del proceso de purificación utilizando el sistema ProBond Purification.

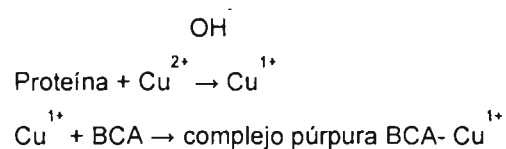
Para los experimentos de purificación primero se tomo 1 ml de resina y se deposito dentro de la columna. Para empaclar la resina la columna se centrifugo a 800g durante 1min y luego se aspiró el sobrenadante. Posteriormente la columna se trato con 4 ml de agua destilada estéril para resuspender la resina por inversión y luego se volvió a centrifugar a 800g durante 1 min. El sobrenadante se descarto y luego se añadieron 8 ml del amortiguador de unión, se mezcló por inversión y se centrifugo a 800g durante 1min para finalmente retirar el sobrenadante.

2.3.1 Purificación de 50RC

Antes de cargar las columnas la mezcla de la reacción obtenida con el sistema Expressway se centrifugo a 15,000g durante 10 min. y temperatura ambiente para remover el material insoluble. Después de este paso se cargo el sobrenadante (contiene la proteína de interés) en la resina equilibrada y se incubo durante 50 min. a una temperatura de 30°C. Posteriormente la columna se centrifugo a 800g durante 1min. Al final de este paso se aspiró el sobrenadante, se hicieron 2 lavados con 2 ml de amortiguador de unión y se centrifugo a 800g durante 1min. Este paso se repitió una vez mas y se descarto el sobrenadante. En el paso final la proteína se eluyó usando el amortiguador que contiene 250 mM de imidazol.

2.3.2 Cuantificación del péptido 50RC

Para la cuantificación del péptido purificado se utilizo el método colorimétrico de Acido bicinconínico (BCA) el cual tiene un rango de sensibilidad de 0.5 a 10 µg. El BCA es una sal sódica, capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporcionan un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan otros métodos.



Para los experimentos se coloco en un tubo 50 partes (100 µl) de reactivo A y 1 parte (2 µl) de reactivo B para formar el reactivo de trabajo de BCA. Formado el reactivo de trabajo de BCA se coloco en un tubo 8 partes de este y 1 parte de muestra de proteínas (para muestras control y muestra problema). Se incubo 20 min. a una temperatura de 65°C y luego se leyó la absorbancia a 562 nm.

3. Síntesis *in vitro* del mRNA que codifica para el péptido 50RC

3.1 Clonación del fragmento de PCR.

La secuencia de interés fue previamente amplificada por PCR y después utilizada para clonarla dentro del vector pCR2.1-TOPO usando la tecnología TOPO TA (Invitrogen). Por lo que la ligación del producto de PCR en el vector se realiza mediante la acción de la enzima topoisomerasa I.

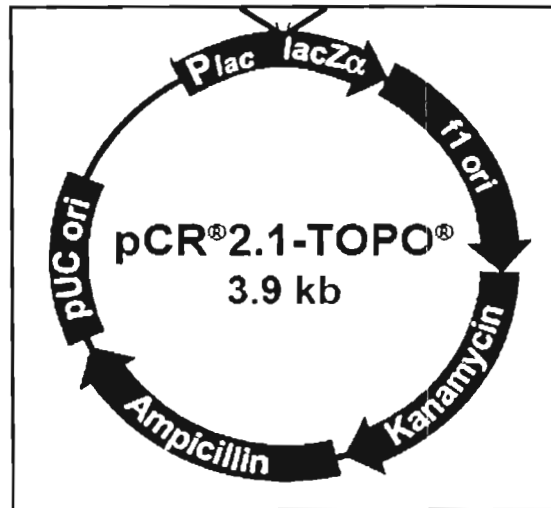


Figura 14. Mapa del vector pCR2.1-TOPO

El vector pCR2.1-TOPO contiene un promotor para la polimerasa T7, un fragmento del gen LacZ α , un lugar para insertar la secuencia de interés (producto de PCR), un gen de resistencia a ampicilina y kanamicina y un origen pUC, como se ilustra en la figura 14.

Reactivo	Volumen (μ l)
Producto de PCR fresco	1
Solución de Sales	1
Agua	3
Vector pCR2.1-TOPO	1
Volumen Final	6

Tabla 16. Reacción de ligación entre el producto de PCR y el vector pCR2.1-TOPO.

Los ingredientes mostrados en la tabla 16 fueron mezclados e incubados durante 5 min. a temperatura ambiente (22-23°C) para ligar nuestro producto de PCR de 150 pb dentro del vector. Para terminar la reacción el tubo se colocó en hielo. Posteriormente el DNA de este

nuevo constructo nombrado fragCFTR-pCR2.1 fue propagado en células de *E. coli* como ya se había descrito anteriormente para el constructo fragCFTR-pEXP5 (Fig. 10).

3.1.1 Obtención y análisis del DNA plasmidico

La purificación del plasmido recombinante fragCFTR-pCR2.1 se realizó poniendo a crecer una colonia de *E. coli* transformada con fragCFTR-pCR2.1 en 10 ml de medio LB e incubando durante 16 horas a 37°C. El DNA plasmidico se purificó utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

En este caso la clonación del inserto fue no direccional y por lo tanto se realizó un análisis de restricción del DNA amplificado. Para esta reacción se incubó 1 µg de DNA con 5 unidades de la enzima Bsu361 y 10 unidades de la enzima RsaI en amortiguador NE3 1X adicionado con 100 µg/ml de BSA. La incubación se realizó a 37°C durante 1.42 horas y al término de la reacción las enzimas se inactivaron por calor incubando la reacción a 80 °C durante 20 min.

3.1.2 Linearización del constructo fragCFTR-pCR2.1

Ya formado el constructo de fragCFTR-pCR2.1 se preparó el DNA para usarlo como patrón en la reacción de transcripción *in vitro*. Primero se linearizó el DNA mediante una reacción de digestión con la enzima Hind III (tabla 17), con este fin se incubaron 10 µg de DNA junto con 10 unidades de la enzima a 37°C durante 1 hora. Al final de la incubación la enzima se inactivó por calor incubando de nuevo la reacción durante 10 min. a 65°C, en un volumen final de reacción de 100µl.

Enzima	Sitio de reconocimiento
Hind III	5'-A AGCTT-3' ----- 3'-T TCGA A-5'

Tabla 17. Sitio de reconocimiento para la enzima Hind III.

La reacción de digestión fue posteriormente tratada con 5 µl de EDTA 0.5M, 10 µl de acetato de amonio 3M y 200 µl de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó durante 30 min. a una temperatura de -20 °C y al término de la incubación se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y el DNA se resuspendió en agua tratada con DEPC.

3.1.3 Extracción con Fenol-Cloroformo

Para purificar el DNA se mezcló el DNA con un volumen igual de fenol-cloroformo hasta formar una emulsión, la cual se centrifugó a 1,600 g durante 3 min. a temperatura ambiente. La emulsión luego se separa en dos fases, la fase acuosa (fase 1) se colocó en un tubo limpio y a la fase orgánica se le agregó un volumen igual de agua DEPC. Todo se mezcló y luego se centrifugó a 1,600 g durante 3 min. La fase acuosa 1 se trató con un volumen igual de fenol-cloroformo, se mezcló hasta formar una emulsión, se centrifugó a 1,600 g durante 3 min. y la segunda fase acuosa se colocó en un tubo limpio. A la fase orgánica se le agregó un volumen igual de agua DEPC, se mezcló hasta formar una emulsión, se centrifugó a 1,600 g durante 3 min y se separó la fase acuosa (fase 2). La fase acuosa 2 obtenida se mezcló con un volumen igual de cloroformo hasta formar una emulsión, se centrifugó a 1,600 g durante 3 min. y después se separó la fase acuosa. A la fase orgánica se agregó agua DEPC, se mezcló hasta formar una emulsión, se centrifugó y se separó la fase acuosa final en un tubo limpio.

Finalmente se estimó el volumen de DNA obtenido en la extracción Fenol-Cloroformo y se ajustó la concentración de cationes agregando acetato de amonio 2M. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó a -20°C durante 1 hora y luego se centrifugó a 12,000 g durante 10 min. a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se descartó y el etanol se evaporó durante 8 min. La pastilla se resuspendió en agua DEPC y el DNA se cuantificó por medio de espectrofotometría.

3.1.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para visualizar el DNA linearizado se corrió un gel de agarosa. El gel se preparó añadiendo 0.27g de agarosa en 30 ml de amortiguador TAE 1X, se disolvió por calentamiento en el horno de microondas y luego se añadió 1 µl de Bromuro de Etidio. La solución se depositó en la cámara de electroforesis y luego se colocó un peine para formar los posillos. Una vez polimerizado el gel se retiró el peine y se sumergió el gel en el tanque de electroforesis que contenía la solución amortiguadora TAE 1X. Se cargaron las muestras y se aplicó un voltaje de 75 mV para separar las muestras. El gel se corrió hasta que el frente del colorante alcanzó el extremo del gel.

3.2 Transcripción in vitro

Posteriormente se realizó la reacción de transcripción y se recuperó el mRNA por precipitación de cloruro de litio. Para la síntesis se utilizó el kit Message mMachine (Ambion) junto con los reactivos mostrados en la tabla 18. Cada tubo de reacción se mezcló gentilmente y se incubó a 37°C durante 6 horas. Al final del tiempo de reacción se añadió 1 µl de DNasa 1, se mezcló bien y se incubó durante 15 min. a una temperatura de 37°C.

Reactivo	Cantidad
Agua libre de nucleasas	llevar a 20.0 μ l
2X NTP/CAP	10.0 μ l
10X Amortiguador de reacción	2.0 μ l
DNA linearizado	2.0 μ g
Mezcla de enzima T7	2.0 μ l

Tabla 18. Reacción de Transcripción con el Kit MMessage mMachine.

3.2.1 Precipitación de mRNA con Cloruro de Litio

Realizada la reacción de transcripción se procedió a precipitar el mRNA agregando 30 μ l de cloruro de litio, se mezcló bien y luego se enfrió durante 2 horas a -20°C . Al término de la incubación se centrifugo a 12,000 rpm durante 15 min. a una temperatura de 4°C . El sobrenadante se removió con cuidado y la pastilla de mRNA se lavo con 1 ml de etanol al 70%; luego se centrifugo a 12,000 rpm durante 15 min. a 4°C . Con cuidado se removió el etanol y el mRNA se resuspendió en agua DEPC. La concentración de mRNA y se determino por espectrofotometría y el mRNA se almaceno a -80°C .

3.2.2 Visualización del mRNA

Para visualizar el mRNA sintetizado se preparo un gel de agarosa al 1.2%. Para esto se pesaron 0.36 g de agarosa y se disolvieron por calor en 26.4 ml de agua DEPC, luego se dejo enfriar un poco y se agregaron 3 ml de amortiguador Mops 10X y 0.6 ml de formaldehído al 37%. Una vez tibia la mezcla se vació en la cámara, se coloco el peine de los positos y se dejo polimerizar. Una vez listo el gel se sumergió en el tanque de electroforesis al que previamente se le había agregado amortiguador Mops 1X.

Antes de cargar las muestras en el gel estas se preparan de la siguiente manera: a un tubo eppendorf se añadieron 2 μ l de mRNA, 3 μ l de amortiguador de carga II (especial para RNA) y 1 μ l de Bromuro de Etidio. La reacción se incubo durante 15min a 65°C e inmediatamente se incubo durante 5 min. a -20°C . Las muestras asi tratadas se cargaron y el gel se corrió a 75 mV durante 1 hora.

4. Evaluar el efecto inhibidor del péptido 50RC sobre las corrientes CaCC endógenas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

4.1 Obtención de los folículos ováricos

Ranas hembras de la especie *Xenopus laevis* se utilizaron para la obtención de ovocitos. Para la cirugía las ranas se colocaron en un recipiente con hielo por espacio de 30 min. hasta producir anestesia total. Posteriormente la rana se colocó en posición dorsal sobre una cama de hielo para mantener la anestesia y usando un bisturí estéril se realizó una pequeña incisión transversal a través de la capa más externa de la piel sobre la superficie ventro-lateral del animal. Para alcanzar la pared del ovario se realizó otra incisión sobre el tejido conectivo y subsecuentemente a través de la primera capa de músculo, evitando dañar otros órganos. De esta manera se dejaron expuestos y visibles los ovocitos. Para extraer una pequeña sección del ovario se utilizaron pinzas finas y cuidadosamente usando tijeras se cortaron varios lóbulos para obtener un número importante de ovocitos. Los ovocitos extraídos se colocaron inmediatamente en una caja de Petri la cual contenía una solución OR libre de Calcio (composición en mM: NaCl 82.5, KCl 2.5, MgCl₂ 1.0, HEPES 5.0, pH 7.6). Enseguida la piel y la capa muscular fueron suturadas de manera separada.

4.1.1 Preparación de los ovocitos para la microinyección del mRNA

Inmediatamente después de ser removidos, los ovocitos se lavaron varias veces en solución OR libre de calcio con la intención de eliminar los desechos celulares y así incrementar su tiempo de supervivencia. Posteriormente los ovocitos se colocaron bajo el microscopio estereoscópico, se retiró la capa epitelial ovárica dejando expuestos a los ovocitos. Este proceso de defoliculación de los ovocitos se realizó manualmente con ayuda de pinzas de disección bajo el microscopio estereoscópico. Inmediatamente los ovocitos se pasaron a otra caja de Petri que contenía solución ND96 (composición mM: NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0 HEPES 5.0, pH 7.6) y antibióticos (Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y 2.5 mM de piruvato de Na⁺ 2.5) y se almacenaron en un incubador a 19°C.

4.2 Microinyección de los ovocitos

Bajo el microscopio estereoscópico se escogieron ovocitos de apariencia saludable y estos se colocaron dentro de una caja de Petri que contenía solución OR libre de Ca⁺² sobre la cual se colocó una malla de nylon. Los ovocitos escogidos se colocaron sobre dicha malla procurando que el ecuador quedara visible para la microinyección. Para la microinyección se escogieron ovocitos que se encontraban en el estadio V o VI tomando como parámetro algunas características físicas. Los diámetros aproximados de los ovocitos fueron de aproximadamente de 1mm, que tenían una marcada diferencia entre el polo animal y vegetal, además de la presencia de una banda ecuatorial.

En estos experimentos se tomo como unidad experimental al ovocito ya que la unidad experimental es aquella que recibe el tratamiento. Por lo tanto, los tratamientos fueron asignados al azar y consistieron de la aplicación de: vehiculo (agua DEPC) o solución con mRNA. La micropipeta previamente llenada con solución o vehiculo fue montada sobre el embolo del microinyector (Nanoliter inyector, WPI) y a través de esta se inyectaron 50 nl de la solución (1 ng/nl de mRNA) o del vehiculo a cada uno de los ovocitos. Los ovocitos ya inyectados se transfirieron inmediatamente a una caja de Petri con ND96 y antibióticos para su posterior incubación a 19°C durante 24 h.

4.3 Fijación de voltaje con dos microelectrodos

Después de una incubación de 24 horas los ovocitos previamente inyectados se colocaron en una cámara para registrar las corrientes de cloruro activadas por calcio (I_{CaCl}) mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. La técnica de fijación de voltaje consiste en empalar al ovocito con 2 microelectrodos llenos con una solución de KCl 3M. En el interior del capilar se encuentra un electrodo de plata/cloruro de plata que esta en contacto con la solución de KCl por un lado y por el otro se conecta a un amplificador. Son dos electrodos, el primer electrodo mide el potencial de membrana (llamado electrodo de voltaje) y el segundo electrodo pasa suficiente corriente para mantener el voltaje fijo (llamado electrodo de corriente) usando para esto un circuito de retroalimentación. La cantidad de corriente que pasa a través del electrodo de corriente esta determinada por la discrepancia entre el potencial de membrana y el voltaje al cual se quiere fijar la membrana.

Para los registros el ovocito se coloca en una cámara de 3 compartimentos. Uno contiene KCl 3M y se encuentra conectado a tierra, otro se encuentra conectado a un sistema de vacío para succionar la solución, y el tercer compartimento es donde se encuentra la célula bañada por la solución extracelular. Este último compartimento se encuentra conectado a la cámara de tierra por medio de un puente de agar.

Los electrodos usados en los registros se obtuvieron a partir de capilares de vidrio (Glass Capillary tubing corning 7056) con ayuda de un estirador KOPF (modelo 720). Los electrodos se llenaron con una solución de KCl 3M para obtener una resistencia entre 0.5 – 2M Ω .

Las corrientes se registraron con ayuda de un amplificador Gene clamp 500 (Axon Instruments) y el programa pClamp 8.0. El análisis de las corrientes se realizo con los programas Clampex 8.0 y Origin 6.0.

El registro de las corrientes se realizo con el siguiente protocolo: primero se aplico un potencial de mantenimiento de -40 mV por 50 ms, seguido por un pulso de prueba de -80 a +120 mV con una duración de 500 ms y luego se repolarizó a -100 mV por 100 ms. Este protocolo se ilustra

en la figura 15. Un protocolo igual pero seguido de una rampa de -80 a +120 mV se aplico para determinar el curso temporal de la corriente a +120 mV cada 10 s. Este protocolo de rampa se repitió 60 veces durante 9 minutos y medio. De los 60 pulsos de prueba aplicados, los primeros 16 corresponden a la aplicación de solución ND96, los pulsos 17 al 44 fueron tomados con solución ND96 mas ionomicina (10 μ M) y los pulsos 45 al 60 fueron tomados con solución ND96.

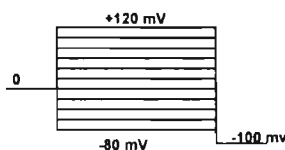


Figura. 15. Protocolo de pulsos para el registro de corrientes.

4.4 Determinación del tamaño de muestra

Para determinar el tamaño muestral primero se realizo un estudio preliminar de las corrientes de cloruro activadas por calcio (I_{CaCl}) utilizando fijación de voltaje con dos microelectrodos.

En estos experimentos los ovocitos fueron expuestos a una solución ND96 con ionomicina (10 μ M) para obtener la máxima activación de I_{ClCa} . Ionomicina es un ionoforo selectivo de Ca^{+2} y su aplicación extracelular provoca una corriente entrante de Ca^{+2} , por lo tanto facilita el incremento de calcio en el citósol y esto activa los canales. Este efecto es dependiente de la dosis.

Primero se administro ionomicina 10 μ M a varios ovocitos para obtener la máxima I_{CaCl} . La cinética de las corrientes se caracterizo antes y después de la administración aguda de ionomicina o de una incubación durante 15 min. con ionomicina. Los ovocitos se estimularon con el protocolo de pulsos mostrado en la figura 15. Así, en cada ovocito se realizaron dos registros: el primero con ND96 y el segundo con ND96 mas administración aguda o incubación con ionomicina (Fig. 16).

Para el análisis de las corrientes se utilizo estadística descriptiva. En la grafica de la figura 16 se muestran los valores promedio de corriente y sus errores estándar. De estos datos se determino que la I_{CaCl} registrada en el grupo con ND96 fue de $4.86 \pm 0.48 \mu A$. Sin embargo esta corriente incremento hasta $8.45 \pm 0.61 \mu A$ después de la administración aguda de ionomicina. En contraste, la I_{CaCl} máxima registrada después de una incubación de 15 min. con ionomicina fue de solo $2.84 \pm 0.36 \mu A$.

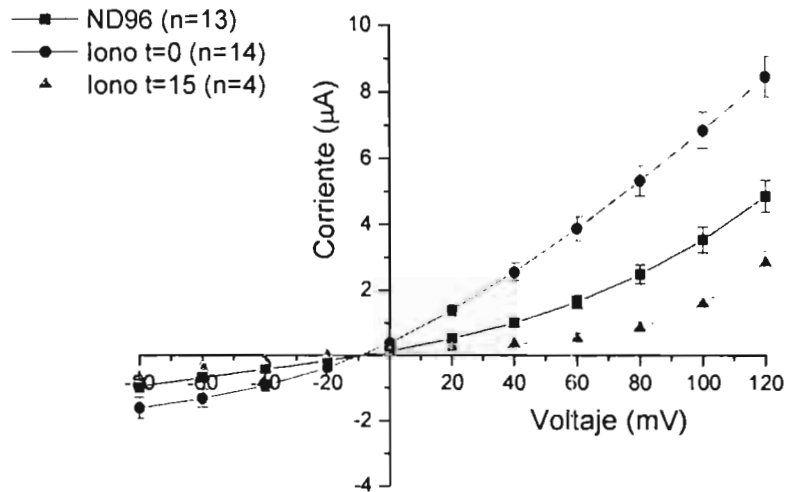


Figura 16. Curva I-V de las I_{CaCl} en presencia de ionomicina $10 \mu M$ en ovocitos de *Xenopus*.

Con estos experimentos se calculo el tamaño muestral adecuado para estudiar el efecto del mRNA en ovocitos. Los datos muestran que para un 95% de nivel de confianza con $\alpha = 0.05$ y un valor de $z_{\alpha} = 1.96$; el nivel de confianza de β sera del 80% con $\beta = 0.2$ y $z_{\beta} = 0.8416$. La formula utilizada para determinar el tamaño muestral utilizado es:

$$n = ((z_{\alpha} + z_{\beta})^2 / \Delta^2) * \sigma^2$$

donde n es el tamaño muestral, Δ es la dispersión entre el valor basal de I_{CaCl} y el valor de I_{CaCl} durante la administración aguda de ionomicina, σ es la desviación estándar de I_{CaCl} máxima a 120 mV. Los valores utilizados son: $\Delta = 3$ y σ de 2.28378 se redondeo a 3 por lo tanto $\sigma = 3$. Sustituyendo estos valores en la formula. $n = ((1.96 + 0.8416)^2 / 3^2) * 3^2$, nos dio como resultado un tamaño muestral de 8 ovocitos para cada grupo, los cuales serán tomados de por lo menos 4 ranas distintas.

RESULTADOS

Construcción del plasmido recombinante que exprese la región carboxi-terminal del dominio R proveniente del CFTR de humano

El DNA patrón hCFTR-EGFP-N1 que se usó en la construcción del plasmido recombinante contiene el gen de CFTR de humano. Este DNA fue propagado, purificado y posteriormente linearizado mediante una reacción de digestión con la enzima NOTI. En la figura 17 se observa una sola banda con un tamaño de 9.2 Kb la cual corresponde al fragmento esperado.

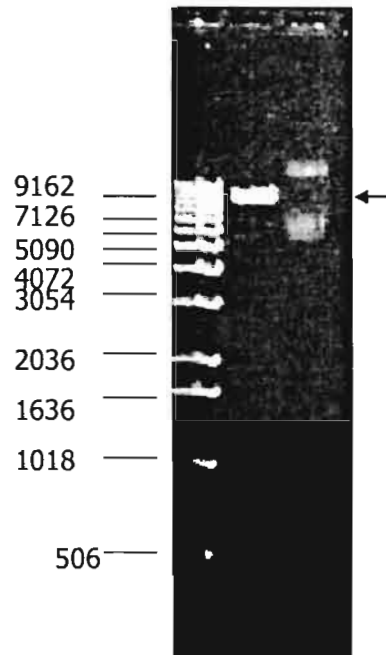


Figura 17. DNA phCFTR-EGFP-N1 linearizado con la enzima NotI. El carril 1 contiene DNA escalera (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), el carril 2 contiene el DNA cortado con NotI y el carril 3 es un control negativo al cual no se le adicionó la enzima de restricción. Gel de agarosa al 1% adicionado con 1 μl de Bromuro de Etidio.

Una vez linearizado este DNA se usó como patrón para amplificar una secuencia de 150 pb del gen de CFTR, la cual codifica para una región de 50 aminoácidos localizada en la porción carboxi-terminal del dominio R (Fig. 18). La amplificación del DNA se realizó por medio de la técnica de PCR usando un par de oligonucleótidos de 20 pb diseñados para flanquear esta secuencia.

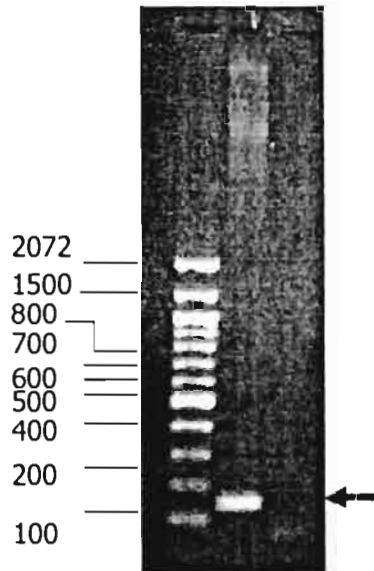


Figura. 18. Fragmento de 150 pb que codifica para la región carboxi-terminal del dominio R de la proteína CFTR. El DNA fue separado en un gel de agarosa al 1.5% adicionado con 1 μ l de Bromuro de Etidio. En el carril 1 se muestra el DNA escalera de 100 pb (1 μ g/ μ l), en el carril 2 se muestra el fragmento de 150 pb (flecha) y en el carril 3 se muestra el control negativo.

La secuencia de interés amplificada por PCR se clonó dentro del vector pEXP5-NT/TOPO usando la tecnología TOPO TA (Invitrogen). El plasmido recombinante fue nombrado fragCFTR-pEXP5. Dado que esta tecnología no permite una clonación direccional se realizó un análisis de restricción para determinar la orientación del inserto. Para este experimento se realizó una doble digestión enzimática con Bsu36I y RsaI, cuyos sitios de reconocimiento en la secuencia del constructo se ejemplifican en la figura 19. Los fragmentos esperados de la digestión para ambas orientaciones también se incluyen en la figura. Para el análisis de restricción se extrajo y purificó el DNA de 12 colonias resistentes a ampicilina, 3 de ellas no incorporaron el inserto, 7 lo incorporaron en la dirección incorrecta y 2 lo incorporaron en la dirección correcta. En la figura 19 se muestra el análisis de 2 colonias, una con el inserto en la dirección correcta (carril 2) y otra con el inserto en la dirección incorrecta (carril 3).

El plasmido recombinante fragCFTR-pEXP5 que contenía el inserto en la dirección correcta se envió al Instituto de Genómica de Cinvestav-Irapuato para su secuenciación. Los resultados de la secuenciación se muestran en la figura 20 y confirman que la secuencia del constructo es correcta. Como se puede apreciar en esta figura el inserto fue clonado en una posición que permite obtener una proteína de fusión formada por el péptido de 50 aminoácidos que tiene unido a su extremo amino terminal una región con 6 histidinas.

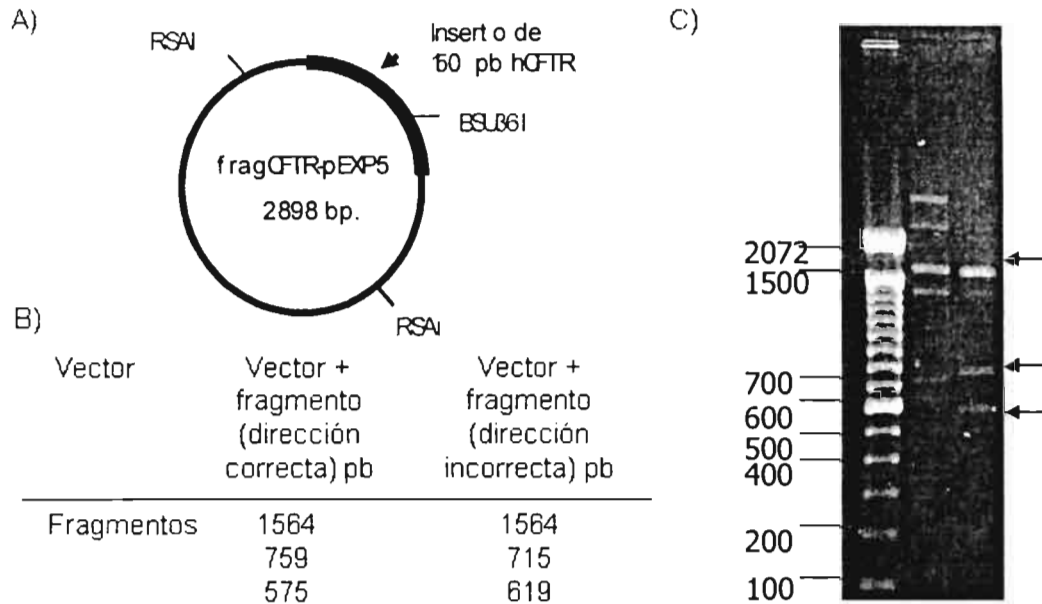


Figura 19. Análisis de restricción del constructo fragCFTR-pEXP5. A) Sitios de corte de BSU36I y RsaI en el plasmido recombinante fragCFTR-pEXP5. B) Tamaño de los fragmentos de DNA que se predicen como resultado de la doble digestión enzimática con BSU36I y RsaI. C) Visualización de los fragmentos de fragCFTR-pEXP5 obtenidos con las enzimas BSU36I y RsaI. Gel de agarosa al 1% adicionado con 1 µl de Bromuro de Etidio. En el carril 1 se muestra el DNA escalera de 100 pb (1 µg/µl), en el carril 2 inserto en la dirección incorrecta y carril 3 inserto en la dirección correcta.

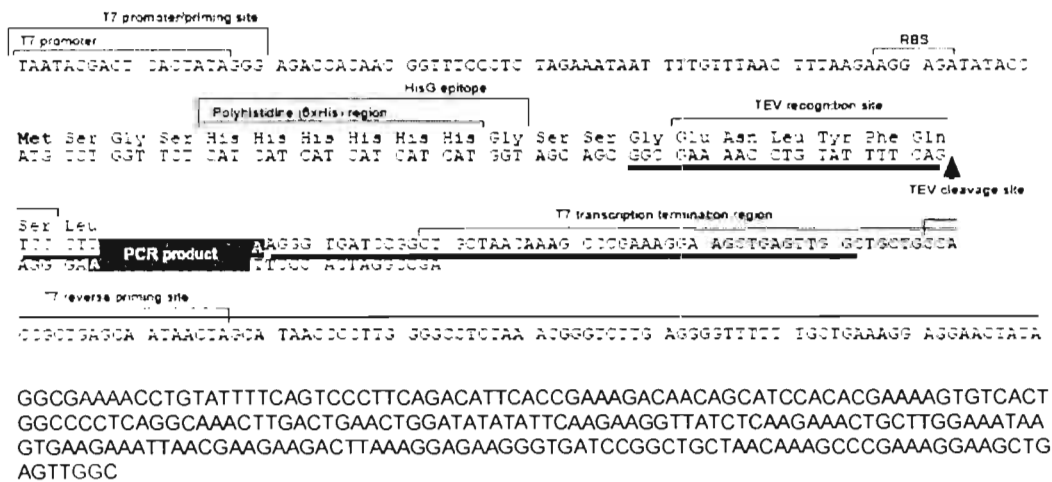


Figura 20. Secuenciación del constructo fragCFTR-pEXP5. A) Mapa parcial del vector pEXP5-NT que muestra el sitio de reconocimiento TEV (secuencia subrayada en verde), el sitio de inserción (recuadro azul) donde se ligo nuestro producto de PCR y la región de terminación para la transcripción (secuencia subrayada en rojo). B) Resultado de la secuenciación de fragCFTR-pEXP5. En verde se aprecia la secuencia del sitio TEV, en azul la secuencia de nuestro fragmento de 150 pb y en rojo parte del sitio de terminación de transcripción. A, Adenina; T, Timina, G, Guanina; C, Citosina.

El plasmido recombinante fragCFTR-pEXP5 se utilizó para sintetizar *in vitro* el péptido de interés con el sistema comercial de Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System (Invitrogen). Este sistema utiliza extracto de *E. coli* optimizado, un amortiguador que contiene un sistema de regeneración de ATP y varios aminoácidos que permiten alcanzar altos niveles de síntesis de proteínas. Las proteínas totales obtenidas por transcripción y traducción *in vitro* con el Sistema Expressway fueron precipitadas con acetona y posteriormente disueltas en un amortiguador de carga. Para la detección de proteínas totales, las cuales incluyen el péptido de fusión, se corrió un gel al 18% de SDS-Poliacrilamida el cual fue inicialmente revelado mediante tinción con Azul de Comassie. Como se puede observar en la figura 21 las flechas indican la posición de las bandas esperadas, las cuales por ser de bajo peso molecular (6-18 kDa) no aparecen bien definidas en el gel. Por esta razón, se decidió correr un segundo gel y revelarlo usando tinción con Nitrato de Plata, el cual es un método de revelado mucho más sensible. En la figura 22 se muestra el resultado de tres reacciones, la primera un control negativo (el DNA del constructo no fue añadido a la mezcla de reacción), la segunda un control positivo donde se sintetizó una proteína de fusión con calmodulina (CALML3) y la tercera realizada con el constructo de interés fragCFTR-pEXP5. Los productos esperados para la segunda y tercera reacción tienen un peso molecular de 18 y 11 kDa, respectivamente.

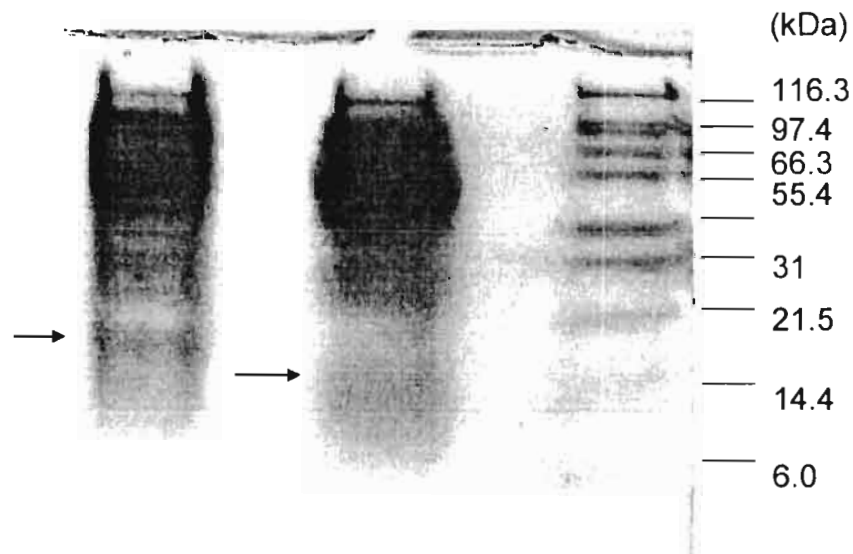


Figura 21. Visualización del péptido 50RC en un gel de SDS-Poliacrilamida teñido con Azul de Comassie. En el carril 1 se muestra la reacción obtenida con el constructo control pEXP5-NT/CALML3, en el carril 2 se muestra la reacción obtenida con el constructo fragCFTR-pEXP5 y en el carril 3 se muestra los marcadores de peso molecular.

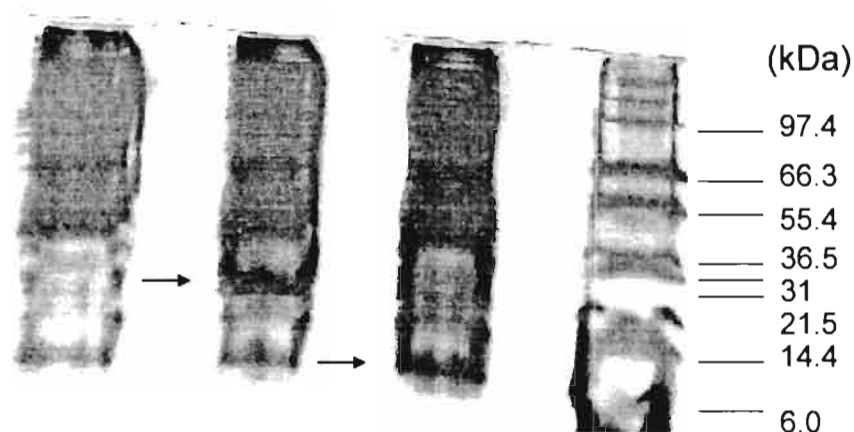


Figura 22. Visualización del péptido 50RC en gel SDS-Poliacrilamida que fue teñido con Nitrato de Plata. En el carril 1 se muestra un control negativo, en el carril 2 un control positivo y en el carril 3 se muestra la banda correspondiente al péptido 50RC. El carril 4 muestra marcadores de peso molecular.

Por último, se utilizó la técnica de Western blot para identificar al péptido de fusión con ayuda de un anticuerpo dirigido contra el epítipo de las 6 histidinas. En estos experimentos, las proteínas se separaron mediante electroforesis y luego fueron transferidas a una membrana de PVDF e incubadas con anticuerpo Anti-His6 conjugado a fosfatasa alcalina. Para revelar las membranas se adicionaron los sustratos NBT y BCIP, los cuales dan una coloración lila. En la figura 23 se observan 3 carriles los cuales contienen un control negativo (carril 2), el péptido 6His-50RC (carril 1) y el marcador de peso molecular (carril 3). El peso del péptido de fusión (6His-50RC) se encuentra cercano al marcador de 15 kDa aunque el peso esperado era de 8 kDa. Esto se debe a que no se incluyó un codón de paro en la secuencia insertada dentro del vector pEXP5-NT y por lo tanto se obtuvo un péptido de fusión que contenía la etiqueta de seis histidinas y 24 aminoácidos adicionales unidos al extremo carboxi-terminal de 50RC. Al recalcular el peso para este constructo se obtuvo un valor de 10.9 kDa, el cual es cercano a lo que aparece en la figura 23.

Finalmente, el péptido se purificó usando columnas de afinidad (sistema ProBond Purification System, Invitrogen) cargadas con resinas de agarosa y Níquel. A través de estas columnas de propileno se hizo pasar el producto de la reacción obtenida con el sistema Expressway Cell Free *E. coli* Systems. Las columnas ya cargadas se eluyeron con una solución que contenía Imidazol para desplazar al péptido de fusión previamente unido a la columna. Posterior a la purificación se cuantificaron las proteínas del eluido utilizando el método colorimétrico de Acido bicinconínico (BCA). Los parámetros de la curva estándar obtenidos fueron $m=311.2263$, $b= -53.4412$. Por extrapolación se determinó que la concentración del péptido 50RC obtenida fue de $0.357 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

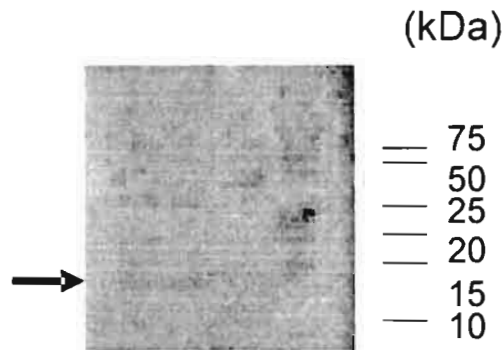


Figura 23. Detección del péptido 50RC por medio de Western blot. Las proteínas totales fueron separadas en un gel al 18% de SDS-Poliacrilamida y luego se transfirieron a una membrana de PVDF. El péptido de fusión se detectó usando un anticuerpo Anti-His6 conjugado a fosfatasa alcalina. En el carril 1 se observa el péptido 50RC, en el carril 2 se cargo el control negativo y en el carril 3 se muestran los marcadores de peso molecular (preteñidos con azul de Comassie).

Síntesis *in vitro* de mRNA que codifica para la región carboxi-terminal del dominio regulador

De manera paralela a la síntesis del péptido de fusión también se realizaron experimentos adicionales diseñados para sintetizar *in vitro* el RNA mensajero que codifica para el péptido 50RC. De esta manera el mRNA inyectado en ovocitos de *Xenopus* permite la producción del péptido en la misma célula donde se evaluara el efecto funcional del péptido 50RC.

Con este fin, la secuencia de interés previamente amplificada por PCR se clono en el vector pCR2.1-TOPO por medio de la tecnología TOPO TA. Este vector contiene lo necesario para la transcripción *in vitro* (ver sección en metodología). Dado que el fragmento de 150 pb se clono de manera no direccional después se realizo una doble digestión enzimática con Bsu36I y RsaI. Un total de 13 colonias fueron seleccionadas para el análisis, de esas 4 colonias no contenían el inserto, 6 colonias tuvieron el inserto en la dirección incorrecta y solo 2 colonias tenían el inserto en la dirección correcta. En la figura 24 se muestran los resultados del análisis de restricción para el constructo fragCFTR-pCR2.1.

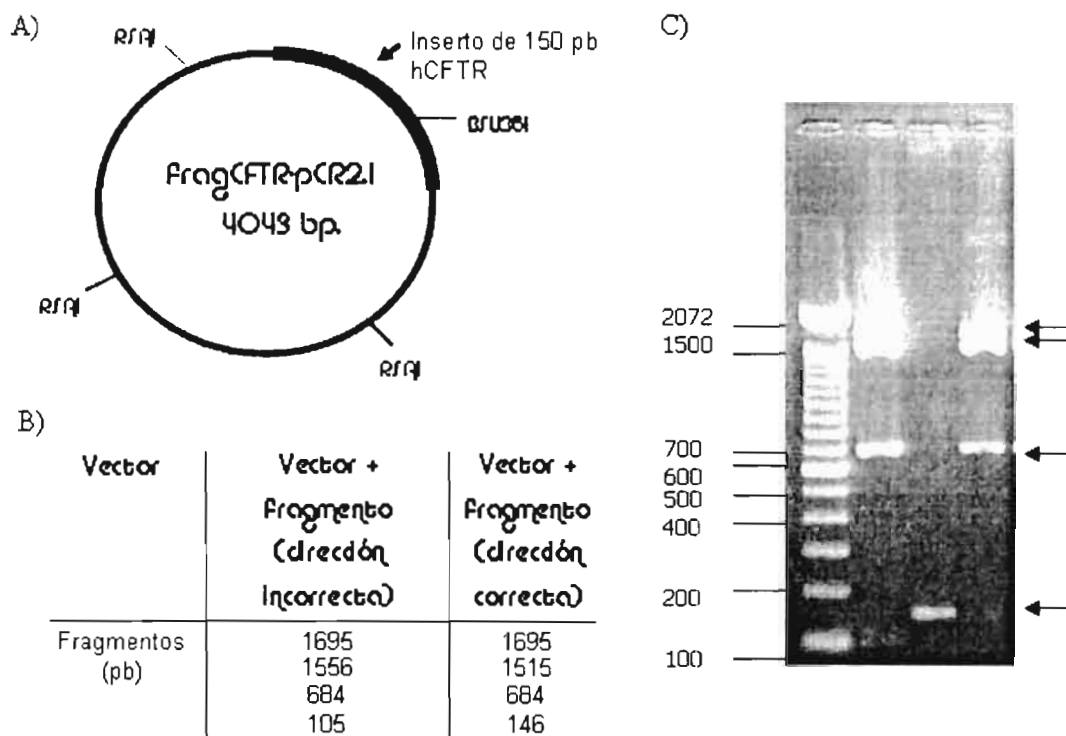


Figura 24. Análisis de restricción del constructo fragCFTR-pCR2.1. A) Sitios de corte de BSU36I y RsaI en el plasmido recombinante fragCFTR-pCR2.1. B) Tamaño de los fragmentos de DNA que se predicen como resultado de la doble digestión enzimática con BSU36I y RsaI. C) Visualización de los fragmentos de fragCFTR-pCR2.1 obtenidos con las enzimas BSU36I y RsaI. Gel de agarosa al 1.5% adicionado con 1 μ l de Bromuro de Etidio. En el carril 1 se muestra el DNA escalera de 100 pb (1 μ g/ μ l), en el carril 2 inserto en la dirección incorrecta, en el carril 3 el fragmento de 150 pb y en carril 4 el constructo con el inserto en la dirección correcta.

La colonia analizada que tenía el inserto en la dirección esperada (carril 3, panel C de la figura 24) fue amplificada para aislar el DNA del plasmido recombinante fragCFTR-pCR2.1. Este DNA se envió al Instituto de Genómica de Cinvestav-Irapuato para su secuenciación. Los resultados se muestran en la Figura 25 y confirman que la secuencia de la clona aislada es la correcta. Una vez confirmada la secuencia del constructo fragCFTR-pCR2.1 se procedió a realizar la transcripción *in vitro*. Primero, el DNA se linealizó mediante una reacción de digestión con la enzima Hind III. En la figura 26 se puede observar que el carril 3 se encuentra un fragmento de aproximadamente 4050 pb que corresponde al tamaño del constructo fragCFTR-pCR2.1 Posteriormente el DNA se purificó mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Este DNA limpio fue el que se usó como patrón para la síntesis de mRNA con ayuda de la RNA polimerasa T7 incluida en el sistema mMessage mMachine (Ambion). El mRNA obtenido de esta reacción se recuperó mediante precipitación con cloruro de litio. En el carril 3

de la figura 27 se aprecia un transcrito con un tamaño menor a 500 pb. El tamaño esperado es de 282 pb.

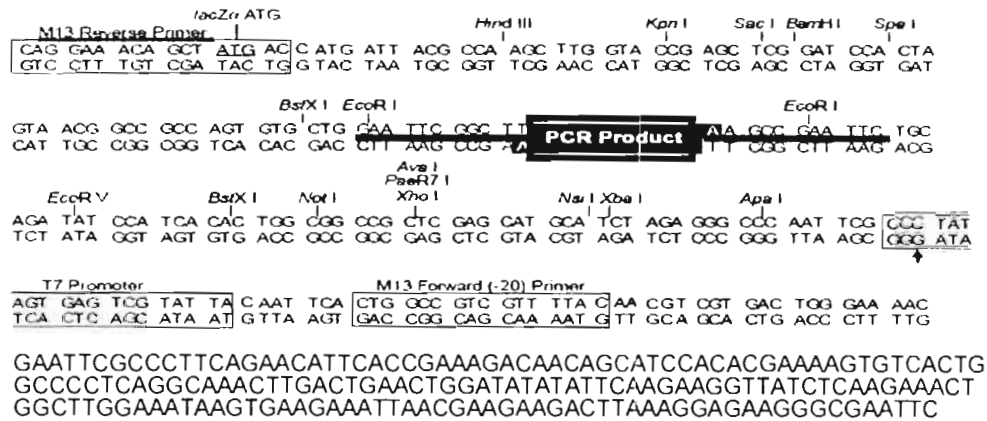


Figura 25. Secuenciación del constructo fragCFTR-pCR2.1 A) Mapa parcial del vector pCR2.1 que muestra el sitio de reconocimiento para EcoRI (secuencia subrayada en azul), el sitio de inserción (recuadro negro rodeado de una línea roja) donde se ligo nuestro producto de PCR y un segundo sitio de reconocimiento para EcoRI (secuencia subrayada en verde). B) Resultado de la secuenciación de fragCFTR-pCR2.1. En azul se aprecia el sitio de reconocimiento EcoRI en el vector pCR2.1, en rojo la secuencia de nuestro fragmento de 150 pb y en verde el segundo sitio de reconocimiento de EcoRI. A, Adenina; T, Timina, G, Guanina; C, Citosina.

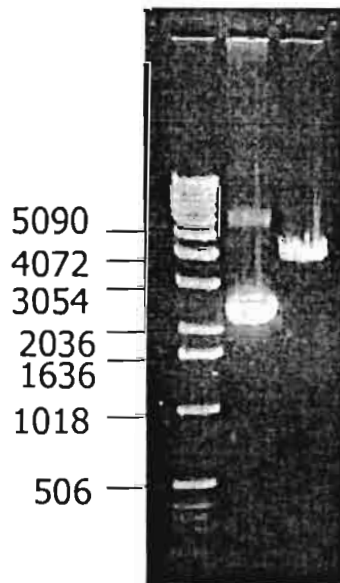


Figura 26. Linearización del plasmido recombinante fragCFTR-pCR2.1. El DNA se visualizo en un gel de 1.0% de agarosa adicionado con 1 µl de Bromuro de Etidio. En el carril 1 se muestra el DNA escalera de 1.0 Kb (1 µg/µl), en el carril 2 se observa el DNA fragCFTR-pCR2.1 sin cortar y en el carril 3 el DNA linearizado con HindIII.

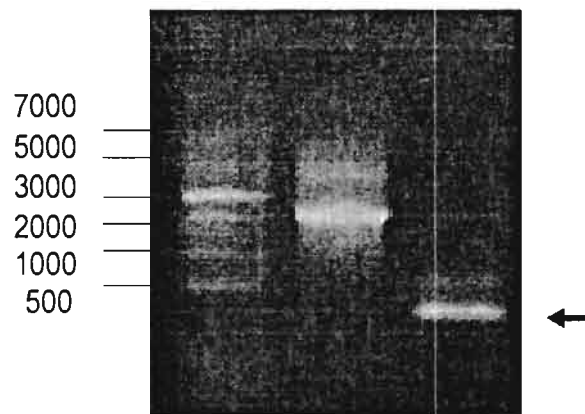


Figura 27. Transcrito obtenido del constructo fragCFTR-pCR2.1. Gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%, teñido con 1 μ l de Bromuro de Etidio. En el carril 1 se muestra la escalera de RNA, en el carril 2 el control positivo para reacción de transcripción y en el carril 3 el mRNA obtenido a partir del DNA fragCFTR-pCR2.1 linearizado (flecha).

Evaluación del efecto inhibitor del péptido 50RC sobre las corrientes endógenas CaCC en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El transcrito obtenido del constructo fragCFTR-pCR2.1 fue posteriormente resuspendido en agua libre de RNAsas a una concentración final de 1 ng/nl. Para estudiar el efecto funcional del péptido 50RC se tomaron 2 grupos de ovocitos, el primer grupo fue inyectado con 50.6 nl de agua libre de RNAsas (n=19) y el segundo grupo fue inyectado con 50 nl de la suspensión de RNA (n=21). Estos ovocitos fueron extraídos de 4 ranas distintas. Ambos grupos de células se incubaron a 19 °C en medio ND-96 durante 24 horas. Pasado este periodo de tiempo se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos para registrar corrientes de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (I_{CaCl}) presentes en los ovocitos. Las corrientes se registraron tanto en ausencia (corriente basal) como en presencia de 10 μ M de ionomicina (corriente máxima) en ambos grupos de células. En la figura 28 se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos con pulsos cuadrados de voltaje que iban desde -80 hasta +120 mV, con incrementos de 20 mV. Estos trazos ilustran la cinética de activación de CaCC después de la activación con ionomicina. Como se puede observar la activación de estos canales se produce a potenciales depolarizantes y la corriente muestra dependencia temporal.

Para la construcción de las curvas corriente-voltaje se utilizó un protocolo consistente en una rampa de voltaje desde -80 hasta +120 mV. La rampa permite además monitorear el curso temporal de la corriente a +120 mV cada 10 s. Como se puede observar en el panel de la izquierda de la figura 29, la ionomicina incrementa de manera notoria la amplitud de la corriente en ovocitos inyectados con agua.

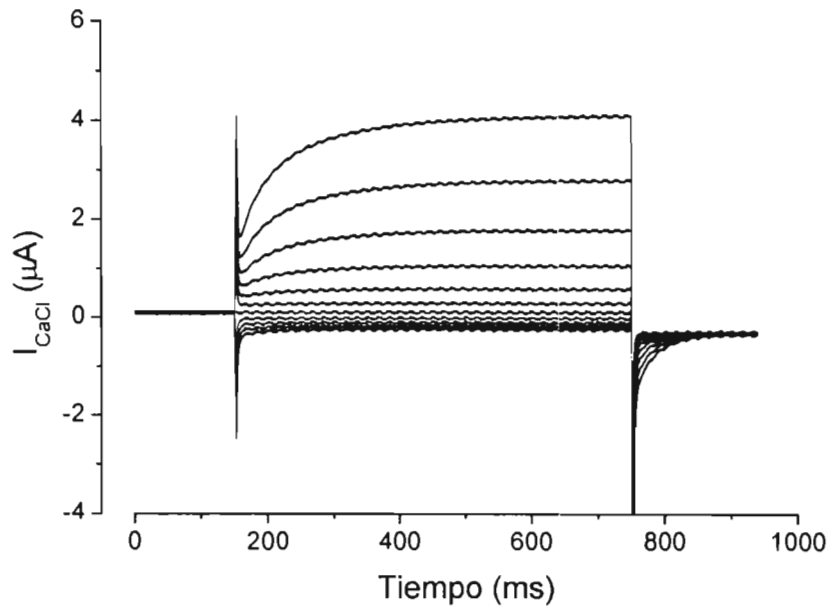


Figura 28. Trazos de corriente a través de CaCC obtenidos de un ovocito representativo. Este registro electrofisiológico muestra la corriente máxima de cloruro obtenida después de la activación con ionomicina. Protocolo: se uso un potencial de mantenimiento de -40 mV por 50 ms, seguido por pulsos de prueba de -80 a +120 mV con una duración de 500 ms y una repolarización a -40 mV por 100 ms.

Este incremento en la corriente se presenta a todos los potenciales y no desaparece por completo aun al realizar un lavado con solución ND96 para retirar la ionomicina durante el registro del curso temporal (datos no mostrados). Por el contrario, el incremento de la corriente basal causado por aplicación de ionomicina fue menor en los ovocitos inyectados con el mRNA que codifica para el péptido 50RC. Esto se puede observar en el panel de la derecha (Fig. 29) al comparar la curva corriente-voltaje de la corriente basal (símbolos negros) con la curva de la corriente activada (símbolos rojos). Estos datos indican que en los ovocitos inyectados con el mRNA la corriente de cloruro dependiente de calcio es inhibida por el péptido 50RC.

La amplitud basal de I_{CaCl} en ovocitos inyectados con agua fue de 3.92 μA a +120 mV. Después de la aplicación de ionomicina la amplitud de la corriente incremento a 8.48 μA . A este mismo voltaje la amplitud basal de I_{CaCl} en los ovocitos inyectados con mRNA fue de 3.47 μA , mientras que al aplicar ionomicina la amplitud de la corriente fue de solo 5.40 μA (Fig. 30). Nuestros datos demuestran que en ovocitos control la aplicación de ionomicina aumenta 2.4 veces la I_{CaCl} mientras que en ovocitos tratados con el péptido 50RC la corriente solo aumenta 1.50 veces.

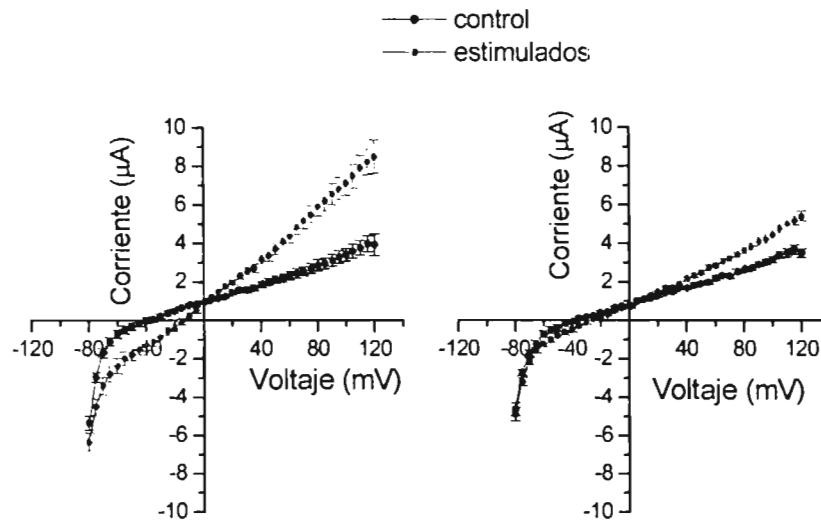


Figura 29. Curvas I-V de ovocitos inyectados con agua o mRNA. En círculos negros se grafica la I_{CaCl} basal y en círculos rojos la I_{CaCl} estimulada con $10 \mu M$ de ionomicina. En el panel de la izquierda se muestran curvas I-V de ovocitos inyectados con agua ($n=19$) y en el panel de la derecha se muestran curvas I-V de ovocitos inyectados con 50 ng mRNA ($n=21$). Estos datos se obtuvieron usando un pulso rampa.

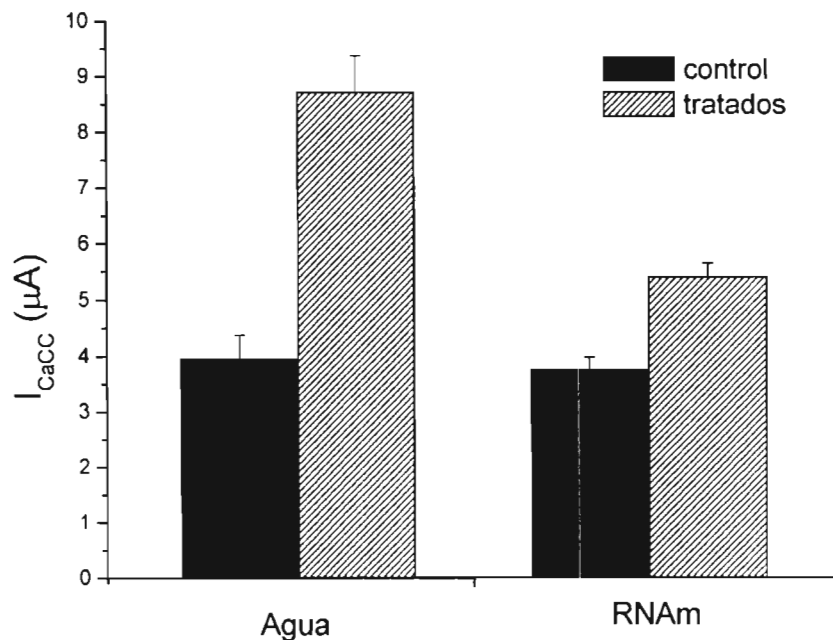


Figura 30. Inhibición de I_{CaCl} causada por el péptido 50RC. Las barras negras muestran I_{CaCl} en condiciones basales y las barras grises muestran I_{CaCl} después de la estimulación con ionomicina. Las dos barras de la izquierda muestra datos obtenidos de ovocitos inyectados con agua y las dos barras de la derecha muestran datos obtenidos de ovocitos inyectados con mRNA. Datos fueron colectados a un voltaje de 120 mV .

Análisis estadístico

A los datos obtenidos experimentales se les aplicó un análisis estadístico utilizando el programa JMP IN (versión 5.0.1) con un nivel de confianza del 95%. El diseño utilizado fue de muestras independientes. Para ello se utilizó la diferencia de los datos, la cual se obtuvo restando la respuesta de I_{CaCl_2} estimulada con ionomicina menos la respuesta de I_{CaCl_2} basal; los residuos de estos datos se obtuvieron para comprobar si los datos tenían una distribución normal. Como hipótesis nula se consideró la igualdad entre las medias o las medianas y como hipótesis alterna la diferencia entre las medias o las medianas.

Se efectuó además la prueba de Shapiro Will para probar la hipótesis de que los residuos son normales, calculando un valor de $w=0.9540$ con una probabilidad de un valor menor si la probabilidad de la hipótesis nula era verdadera igual a <0.1570 . Dado que se acepta la normalidad de los residuos se examinó los coeficientes de simetría dando sesgo positivo = -0.3932 y de kurtosis = -0.2936 .

Se efectuó la prueba de Brown Forsythe para probar la hipótesis que las varianzas son homogéneas con una F calculada de 2.2076 con la probabilidad de un valor mayor si la hipótesis de nulidad es verdadera de 0.1458 . Por lo cual se acepta que la hipótesis de nulidad ya que las varianzas son homogéneas. No existe evidencia de que las varianzas sean heterogéneas.

Se efectuó un análisis paramétrico de t-student donde la hipótesis de nulidad es que las medias de las poblaciones de donde se extrajeron las muestras son iguales y la hipótesis alterna es que las medias son diferentes. El valor de t calculado de 3.0394 con una probabilidad de un valor mayor si la hipótesis de nulidad es verdadera de <0.0001 . Por lo cual se rechaza la hipótesis de nulidad y se acepta la hipótesis alterna de que las medias son diferentes. La media de 4.7644 es mayor que la media de 1.7250 . El poder de la prueba fue de 0.9994 .

Por medio de este análisis estadístico podemos concluir que la presencia del péptido 50RC en los ovocitos inhibe significativamente la corriente de cloruro dependiente de calcio (Fig. 31).

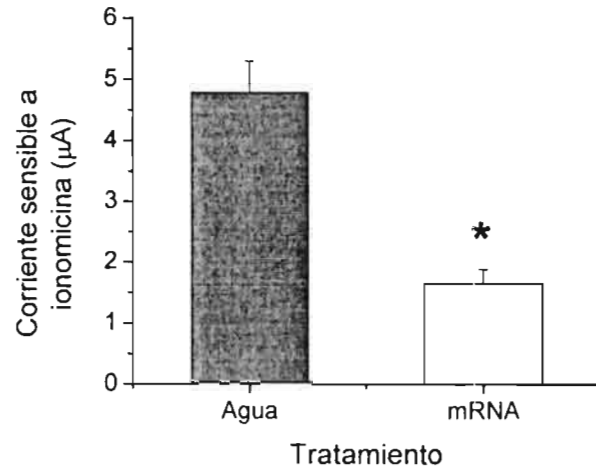


Figura 31. Efecto del mRNA para 50RC sobre la amplitud de la corriente activada por ionomicina. Los datos mostrados se obtuvieron sacando la media de I_{CaCl} con ionomicina menos I_{CaCl} basal registradas a +120 mV. La barra gris muestra la corriente activada por ionomicina en ovocitos inyectados con agua (control, $n=19$) y la barra amarilla muestra la corriente activada en ovocitos inyectados con mRNA ($n=21$). Diferencia estadísticamente significativa con $p<0.05$.

Discusión

En estudios preliminares se ha visto que los CaCCs muestran regulación por diversas señales entre ellas distintos aniones permeantes (tiocianato), protones, CaMKII, fosfatasa, Anexinas, proteínas G, y el regulador de la conductancia transmembranal de cloruro (CFTR).

El canal CFTR ejerce un efecto regulador sobre varios canales iónicos, entre ellos los CaCC. El modo preciso de la interacción entre CFTR y CaCC no es claro. Sin embargo, la regulación de CaCC por CFTR implica algún tipo de interacción entre estas proteínas. Para explicar esta interacción se podrían proponer varios mecanismos tales como:

- 1) una interacción mediada por una tercera proteína
- 2) una interacción mediada por el flujo de iones a través de CFTR. Esto implica una regulación dependiente de la actividad de CFTR. Por ejemplo, en células acinares de la parótida de ratón I_{CaCl} es inhibida por AMPc intracelular. El 50% de la inhibición total esta mediada por activación de PKA en ratones silvestres, sin embargo en ratones CFTR^{-/-} la inhibición de I_{CaCl} por AMPc desaparece. Esto sugiere en células acinares AMPc activa a PKA, la cual fosforila a CFTR y esto finalmente produce la activación de CFTR con la consecuente inhibición de I_{CaCl} (17).
- 3) una interacción proteína-proteína en membrana plasmática. Esto implica que CFTR podría actuar directamente sobre el CaCC. La modulación de CaCC por CFTR como ya se menciono puede darse independiente de la actividad de CFTR ya que se ha visto que la expresión de $\Delta F508$ CFTR no tiene influencia en la corriente de CaCC (11). Esta mutación resulta en un procesamiento incorrecto de la proteína por lo que CFTR no puede ser exportado a la membrana plasmática. Estos datos indican que para que se produzca una interacción entre CaCC y CFTR, esta última proteína tiene que estar presente en la membrana plasmática. En células acinares y células del ducto de las glándulas salivales se sabe que CFTR esta presente en la membrana apical. Dado que en células acinares se ha propuesto que CaCC también se localiza en la membrana apical entonces se podría presentar una interacción proteína-proteína en estas células. Reportes previos muestran una interacción entre CaCC y CFTR en células de la arteria pulmonar de bovino (células CPAE). En esta línea celular se ha demostrado que CFTR también inhibe las corrientes CaCC endógenas (23). Todos estos datos muestran que al menos existe una colocación de ambas proteínas, lo cual permite pensar en una interacción directa entre CaCC y CFTR.
- 4) una interacción a nivel del retículo endoplasmico. CFTR podría asociarse a CaCC durante su paso por el retículo endoplasmico. De esta manera, CFTR podría influenciar la inserción del CaCC en la membrana, reduciendo de algún modo los niveles de expresión CaCC en la célula. Este mecanismo aun no ha sido estudiado.

El objetivo de este estudio fue evaluar la regulación que sobre CaCC ejerce CFTR. Específicamente demostramos que un péptido de 50 aminoácidos (péptido 50RC), el cual reproduce la región carboxi terminal del dominio R, es suficiente para regular corrientes CaCC endógenas en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Estudios preliminares han demostrado que en CFTR el dominio R consta de una parte N-terminal (un tercio del dominio) y una parte C-terminal (dos tercios de dominio). Los 50 aminoácidos en posición 780-830 constituyen la parte carboxi terminal y se ha demostrado que son importantes para la regulación de la actividad de CaCC por CFTR. También se ha reportado que al cambiar los aminoácidos cargados negativamente por otros cargados positivamente o bien al deletar esta región de 50 aminoácidos se produce una pérdida de la actividad de CFTR, además de que se pierde la interacción con CaCC (23). Basados en estos antecedentes en nuestro estudio propusimos ver el efecto de estos 50 aminoácidos sobre la regulación de las corrientes a través de CaCC. Para ello decidimos producir un péptido idéntico a la región carboxy terminal del dominio R de la proteína CFTR, al cual llamamos péptido 50RC. Los ensayos funcionales con el péptido muestran que 50RC regula a la baja la corriente a través de CaCC.

El tratamiento que recibieron los ovocitos fue una inyección con agua o mRNA, con el fin de contrastar el efecto funcional del péptido en estos grupos de células. La exposición de los ovocitos a ionomicina fue a las 24 horas posterior a la inyección. Dado que la respuesta a ionomicina (un ionoforo selectivo a calcio) es dependiente de la dosis, en nuestros experimentos solo se utilizó una concentración de 10 μM ya que a esta concentración se obtiene la máxima activación de las corrientes de cloruro dependientes de calcio (I_{CaCl}). Los datos obtenidos con este protocolo muestran que la expresión del péptido 50RC en el ovocito se lleva a cabo de manera eficiente dentro de las primeras 24 h posteriores a la inyección del mRNA. En esos experimentos también se observó que las corrientes basales de CaCC no sufren ninguna modificación por la presencia del péptido 50RC. Sin embargo, al estimular I_{CaCl} con ionomicina se observa una disminución significativa de esta corriente solo en los ovocitos inyectados con el mRNA que codifica para 50RC.

En la literatura existen reportes que sugieren que la regulación de CaCC puede ser dependiente o independiente de la actividad de CFTR (23). Si esto es así, mecanismos distintos podrían operar en cada caso. En nuestro estudio, la regulación de CaCC parece ser independiente de la actividad de CFTR, por lo que proponemos un mecanismo de regulación basado en una interacción proteína-proteína. Este mecanismo es apoyado por nuestros datos que demuestran que al inyectar el mRNA que codifica para el péptido 50RC se puede observar una disminución significativa en la corriente de los CaCC que previamente se activó con 10 μM de ionomicina. Nuestros hallazgos también concuerdan con otros estudios que demuestran que

la expresión de la proteína CFTR en ovocitos produce la inhibición de las corrientes de CaCC endógenas (6).

En este trabajo también se produjo *in vitro* el péptido 50RC y se demostró su presencia por medio de Western blots, aunque no se probó su efecto funcional debido a que se obtuvieron cantidades pequeñas del mismo. Sin embargo datos preliminares de nuestro laboratorio, realizados con un péptido sintético (Gensystem) muestran que el efecto de 50RC en células acinares es similar al efecto obtenido aquí con ovocitos de rana *Xenopus*. Por lo que los datos de nuestro laboratorio nos llevan a pensar que la interacción vista entre CFTR y CaCC es mediada por una interacción proteína-proteína.

Los experimentos a futuro contemplan la inyección del péptido 50RC tanto en ovocitos como en células acinares para ensayar electrofisiológicamente el efecto funcional del péptido sobre los canales endógenos. También se tiene contemplado determinar la estructura terciaria del péptido 50RC en solución ya que aun no se tienen datos de la estructura que adopta la región carboxi terminal del dominio R en CFTR.

Conclusión

El canal de cloruro activado por calcio endógeno de ovocitos de *Xenopus laevis* es modulado por CFTR a través de la región carboxi terminal del dominio regulador, sugiriendo que sea mediante una interacción proteína-proteína.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDREW C. ZYGMUNT. Physiological role of the Ca^{+2} -activated Cl^- currents in mammalian heart. Catherine Mary Fuller in: Calcium-Activated Chloride channels. Vol. 53: Chapter 4, 2002.
2. ARREOLA JORGE AND PEREZ-CORNEJO PATRICIA. Functional properties of Ca^{+2} -Dependent Cl^- Channels and Bestrophins: Do they Correlate?. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 38:181-198, 2006.
3. EGGERMONT JAN. Calcium-activated Chloride Channels (Un)know, (Un)loved? *Proceedings of the American Thoracic Society* 1:22-27, 2004.
4. FULLER CATHERINE M., JI HONG-LONG, TOUSSON ALBERT, ELBLE RANDOLPH C. PAULI BENDECHT U. BENOS DALE J. Ca^{+2} activated Cl^- channels: a newly emerging anion transport family. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*. 443 Suppl1:107-S110, 2001.
5. GADSBY DAVID C. AND ANGUS C. NAIRN. Control of CFTR Channel Gating by Phosphorylation and Nucleotide Hidrolysis. *Physiol Reviews* 76: Supple1: S77-S107, 1999.
6. GÍRON MORENO ROSA MARÍA, SALCEDO POSADAS ANTONIO. Fibrosis Quistica, *Monografías de la Sociedad Madrileña de Neumonología y Cirugía Torácica*, vol. VIII, 2005.
7. GREGER R., SCHEREIBER R., MALL M., WISSNER A., HOPF A., BRIEL M., BLEICH M., WARTH R., KUNZELMANN K. Cystic fibrosis and CFTR. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*. 443 Suppl1: S3-S7, 2001.
8. HARTZEL CRISS, PUTZIER ILVA, AND ARREOLA JORGE. Calcium-Activated chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 67:719-58, 2005.
9. HERMONA SOREQ AND SHLOMO SEIDMAN in *Methods in enzymology*, vol. 207 Chapter14, 1992.
10. JAMES L. KENYON AND RODERICK H. SCOTT. Ca^{+2} -Activated Cl^- Channels as Ca^{+2} sensors with particular Reference to the Modulation of Neuronal Excitability. Catherine Mary Fuller in: Calcium-Activated Chloride channels. Vol. 53, Chapter 7, 2002.
11. JAMES E. MELVIN, JORGE ARREOLA, KEITH NEHRKE, AND TED BEGENISICH. Ca^{+2} -Activated Cl^- currents in salivary and Lacrimal Glands. Catherine Mary Fuller in: Calcium-Activated Chloride channels. Vol. 53, Chapter 10, 2002.

12. KHALED MACHACA, ZHIQIANG QU, AKINORI KURUMA, H. CRISS HARTZELL, AND NAEL MCCARTY. The Endogenous Calcium-Activated Cl Channel in *Xenopus* Oocytes: A physiologically and Biophysically Rich Model System. Catherine Mary Fuller in: Calcium-Activated Chloride channels. vol. 53, Chapter 1, 2002.
13. KUNZELMANN K., MALL M., BRIEL M. HIPPER A., NITSCHKE R. RICKEN S., GREGER R., The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca activated Cl- conductance of *Xenopus laevis*. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 435:178-181, 1997.
14. MARTÍNEZ ROSAS MARTÍN, Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de cardiología de Mexico* Vol. 74, Supl. 2, 60 Aniversario/Abril-Junio:S205-S210, 2004.
15. MELVIN JAMES E., YULE DAVID, SHUTTLEWORTH TREVOR, AND BEGENISICH TED. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol.* 67:445-69, 2005.
16. LEDUC-NADEAU A., LAHJOUJI K. BISSONNETTE P. LAPOINT J-Y. AND BICHET D.G. Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292: C1132-C1136, 2007.
17. PEREZ-CORNEJO PATRICIA AND ARREOLA JORGE. Regulation of Ca⁺-activated chloride channels by cAMP and CFTR in parotid acinar cells. *Elsevier.* 316:612-617, 2004.
18. RICHTER JOEL D. Gene expression using *Xenopus* oocytes. *Curr Opin Biotechnol.* Oct; 2(5):698-703, 1991.
19. STEVEN J. KLEENE. The Calcium-Activated Chloride Conductance in Olfactory Receptor Neurons. Catherine Mary Fuller in: Calcium-Activated Chloride channels. 2002, volume 53, Chapter 6.
20. THURMAN CARL L. BURNS. JON S. O'NEIL ROGER G. Identifying the Ca⁺⁺ signalling sources activating chloride currents in *Xenopus oocytes* using ionomycin and thapsigargin. *Cellular Signalling.* 12:629-635, 2000.
21. VANKEERBERGHEN ANNE, LIN WEI, JASPERS MARTINE, CUPPENS HARRY, NILIUS BERND AND CASSIMAN JEAN-JACQUES. Functional Characterizations of the CFTR R Domain Using CFTR/MDR1 Hybrid and Deletion Constructs. *Biochemistry,* 38:14988-14998, 1999.
22. WEI LIN, VANKEERBERGHEN, CUPPENS HARRY, EGGERMONT JAN, CASSIMAN JEAN-JAQUES, DROOGMANS GUY, NILIUS BERND. Interaction between calcium-activated

chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 438: 635-641, 1999.

23. WEI LIN, VANKEERBERGHEN ANNE, CUPPENS HARRY, CASSIMAN JEAN-JAQUES, DROOGMANS GUY, NILIUS BERND. The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca activated Cl- channels. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 442:280-285, 2001.

