

Contenido

1. Resumen.....	6
2. Abstract	7
3. Introducción	8
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos	21
5.1 General.....	21
5.2 Específicos	21
6. Metodología	22
6.1 Mutagénesis sitio dirigida	22
6.1.1 Obtención de productos de PCR.	23
6.1.2 Reconstitución de los canales	25
6.1.3 Confirmación de mutación.....	27
6.2 Manejo del cultivo de células HEK-293.	27
6.3 Transfección transitoria de células HEK-293 con los cDNA de los canales WT y Mutantes.27	
6.4 Caracterización electrofisiológica mediante <i>patch-clamp</i> de los canales transfectados. 28	
6.5 Análisis de las propiedades biofísicas de las corrientes registradas.	28
6.6 Análisis estructural de las mutaciones.....	29
7. Resultados.....	30
7.1 Mutagénesis sitio dirigida	30
7.1.1 K ₂ P9	30
7.1.2 Reconstitución K ₂ P9 mutado.....	32
7.1.3 K ₂ P10	34
7.1.4 Reconstitución K ₂ P10 mutado.....	35
7.2 Confirmación de la mutación.	37
7.3 Ensayos electrofisiológicos.....	37
7.4 Análisis estructural de las mutaciones.....	42
8. Discusión	46
9. Conclusiones.....	48
10. Bibliografía	49
11. Anexos.....	51

Índice de Figuras

Imagen 1 Esquema de la bicapa fosfolipídica.	8
Imagen 2 Distribución de iones de importancia biológica en los medios intra y extracelular.	9
Imagen 3 Representación de la membrana plasmática y diferencias de concentración iónica en los medios intra y extracelular	10
Imagen 4 Esquema de un potencial de acción.....	13
Imagen 5 Estructura de un canal de potasio.....	14
Imagen 6 Sitios de unión a potasio dentro del filtro de selectividad.....	15
Imagen 7 Distribución de los iones dentro del filtro de selectividad intercalados por agua.....	16
Imagen 8 Bases energéticas de la selectividad iónica.....	16
Imagen 9 Comparación de secuencia de filtro de selectividad de diferentes canales de potasio ...	18
Imagen 10 Representación topológica simple de los canales K ₂ P.	19
Imagen 11 Árbol filogenético con Nomenclatura de HUGO	20
Imagen 12 Diagrama de mutagénesis sitio-dirigida mediante <i>Overlap Extension</i>	22
Imagen 13 Resultados primera ronda de PCR K ₂ P9	30
Imagen 14 Resultados segunda PCR <i>Overlap Extension</i> K ₂ P9	31
Imagen 15 Doble digestión vector K ₂ P9	32
Imagen 16 Comprobación de ligación K ₂ P9	33
Imagen 17 Primera PCR <i>Overlap extensión</i> K ₂ P10	34
Imagen 18 Segunda PCR <i>Overlap Extension</i> K ₂ P10.	35
Imagen 19 Doble digestión vector K ₂ P10	36
Imagen 20 Comprobación de ligación K ₂ P10.	37
Imagen 21 Protocolo de pulsos utilizado.	38
Imagen 22 Corrientes representativas del canal K ₂ P10.	38
Imagen 23 Corrientes representativas del canal K ₂ P9.	39
Imagen 24 Curva I-V del promedio de las corrientes registradas para el canal WT y mutante G278E del canal K ₂ P10.	40
Imagen 25 Curva I-V del promedio de las corrientes registradas para el canal WT y la mutación G201E del canal K ₂ P9.....	41
Imagen 26 Segundo dominio de poro canal K ₂ P9	42
Imagen 27 <i>Backbone</i> primer dominio de poro K ₂ P9	43
Imagen 28 Segundo dominio formador de poro canal K ₂ P10.....	44
Imagen 29 <i>Backbone</i> del primer dominio formador de poro canal K ₂ P10.	45

Índice de Tablas

Tabla 1 Secuencias de partidores utilizados durante la PCR.....	24
---	----