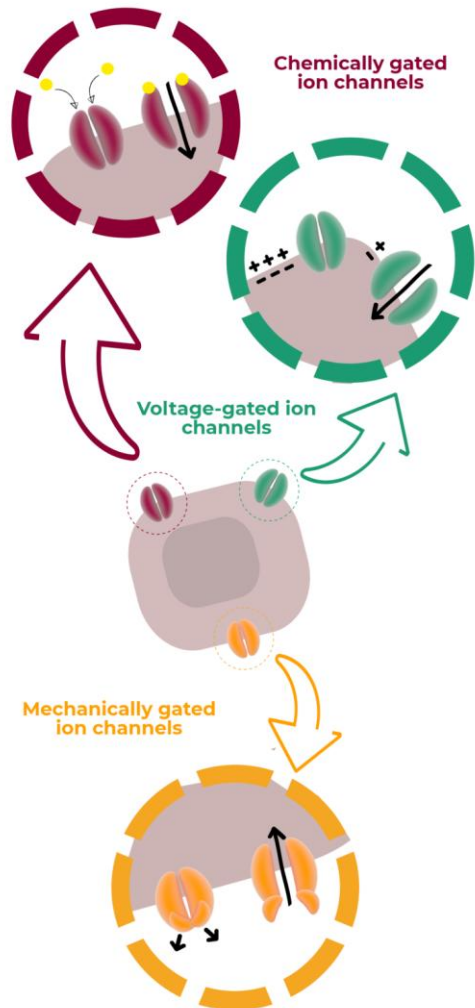


Jornada de Prestaciones de los SCTs del IBVF

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis

PLAN DE EXCELENCIA Deep-MaX



ELECTROFISIOLOGÍA

Natalia Alejandra Raddatz Cárdenas

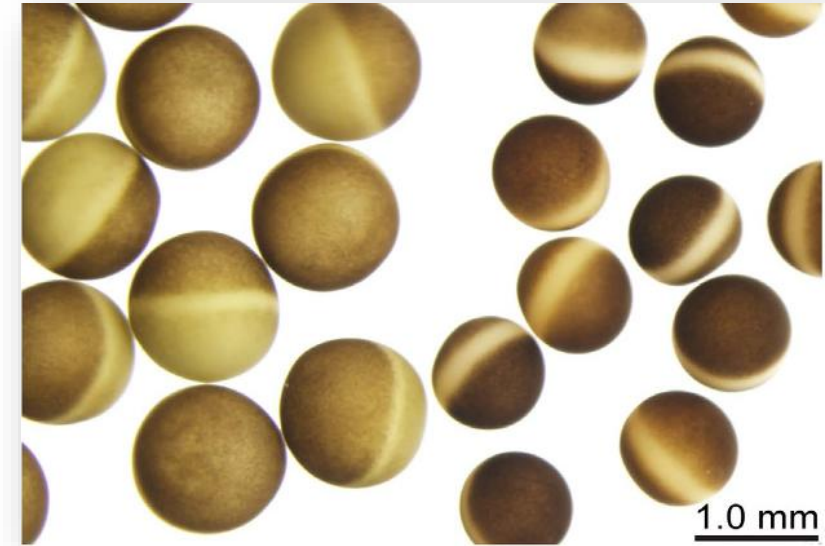


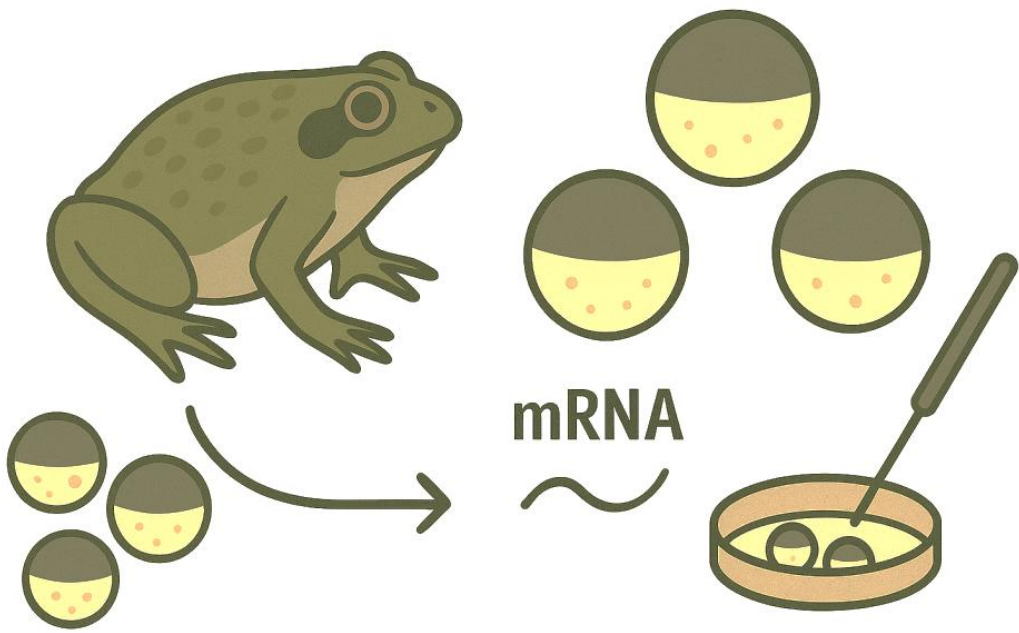


¿Por qué utilizamos ovocitos de *Xenopus laevis*?

Características de los ovocitos de *Xenopus laevis*

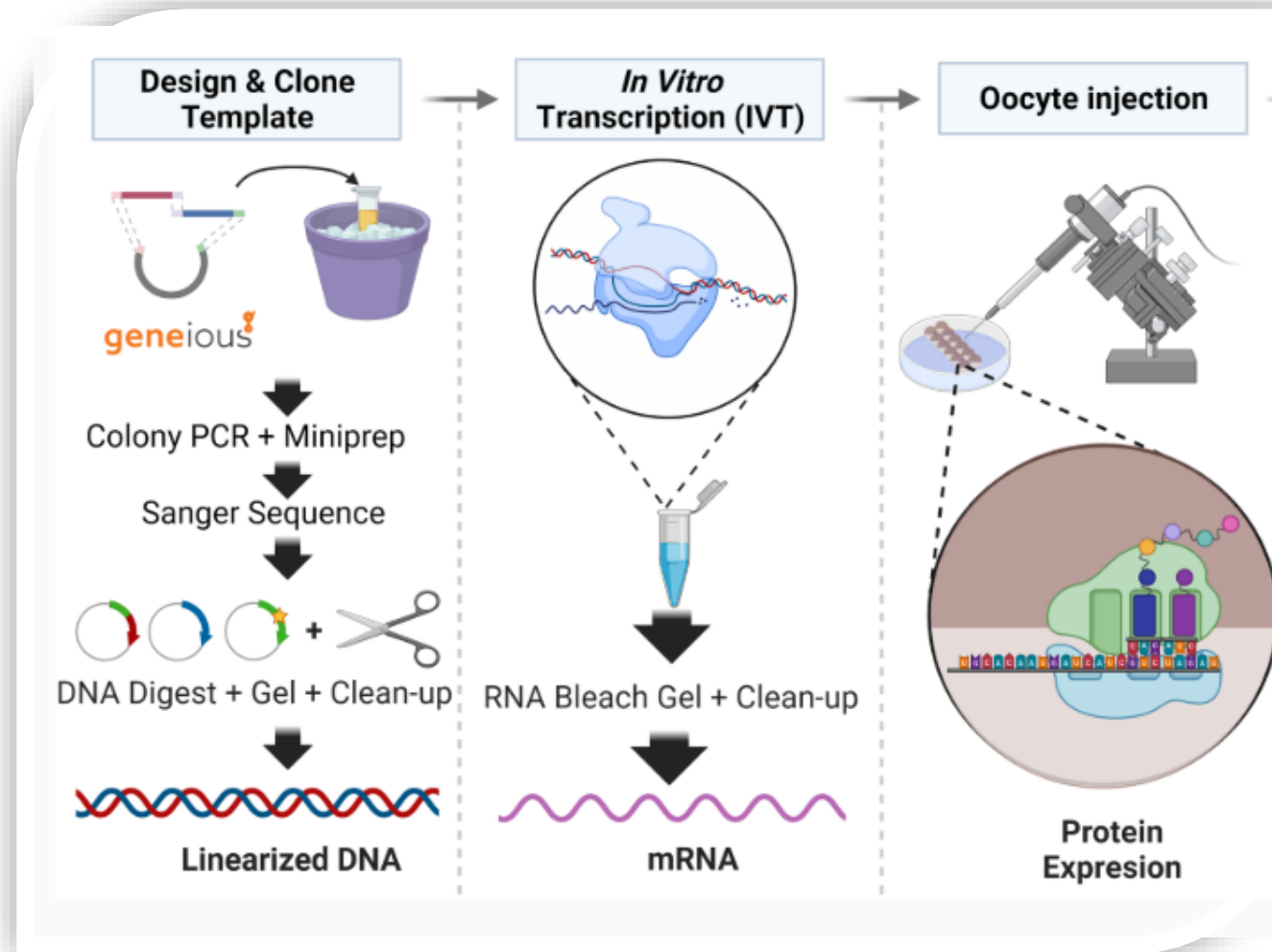
- **TAMAÑO Y MANIPULACIÓN:** los ovocitos (~1 mm) son grandes y sencillos de microinyectar, manipular y visualizar. Esto facilita la introducción de ARN/mRNA, DNA o proteínas.
- ***Completamente equipados con maquinaria de traducción:*** el ovocito adulto es un depósito de ARNm y proteínas maternos listos para la embriogénesis temprana.
- ***Alta capacidad de expresión:*** expresan eficientemente proteínas heterólogas de membrana, muchas veces con orientación y procesamiento adecuados para funcionalidad.
- ***Bajo “fondo” funcional para muchas proteínas:*** comparados con células heterólogas cultivadas, a veces permiten distinguir mejor la actividad de la proteína expresada (aunque hay corrientes endógenas que conviene controlar).
- ***Las proteínas multiméricas se ensamblan correctamente:*** y los parámetros biofísicos son comparables a los obtenidos con diferentes enfoques en el cultivo primario, la línea celular y el entorno de membrana nativo.





¿Cómo podemos utilizar los ovocitos de *Xenopus laevis*?

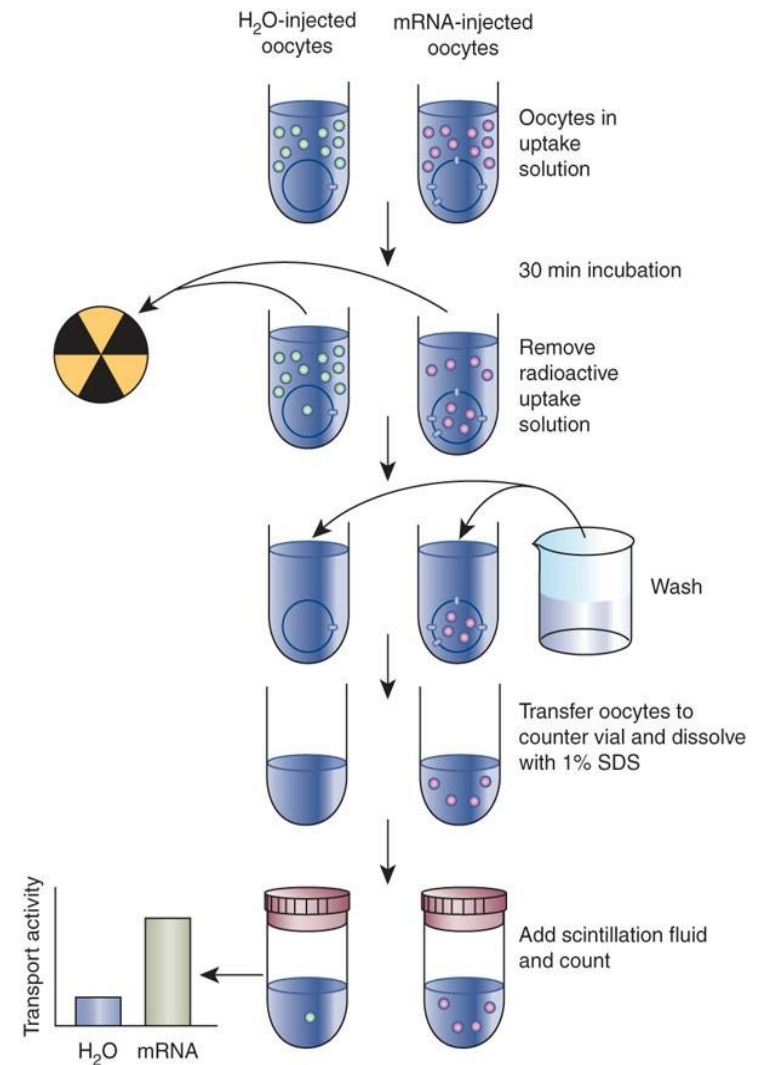
Preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis*



- Promotor para la transcripción in vitro (T7 o SP6).
- Cola poliA
- Sitio múltiple de clonación
- Regiones no traducidas (UTRs) optimizadas. Las UTRs 5' y 3' deben ser cortas o derivar de proteínas de *Xenopus laevis* (habitualmente β -globina), ya que estas secuencias aumentan significativamente la eficiencia de traducción en ovocitos microinyectados.
- Sitio de restricción único para linearización .
- Vectores comúnmente utilizados : pGEMHE, pGH19, pAMV, pOO2 y pGem-He-Juel

Captación o entrada de sustrato

Mide la **entrada de un sustrato específico** (por ejemplo, aminoácidos, azúcares o vitaminas) en ovocitos que expresan un transportador heterólogo, cuantificando cómo el transportador facilita el movimiento del sustrato a favor de su gradiente.



MARKOVICH, Daniel. *Nature protocols*, 2008, vol. 3, no 12, p. 1975-1980.

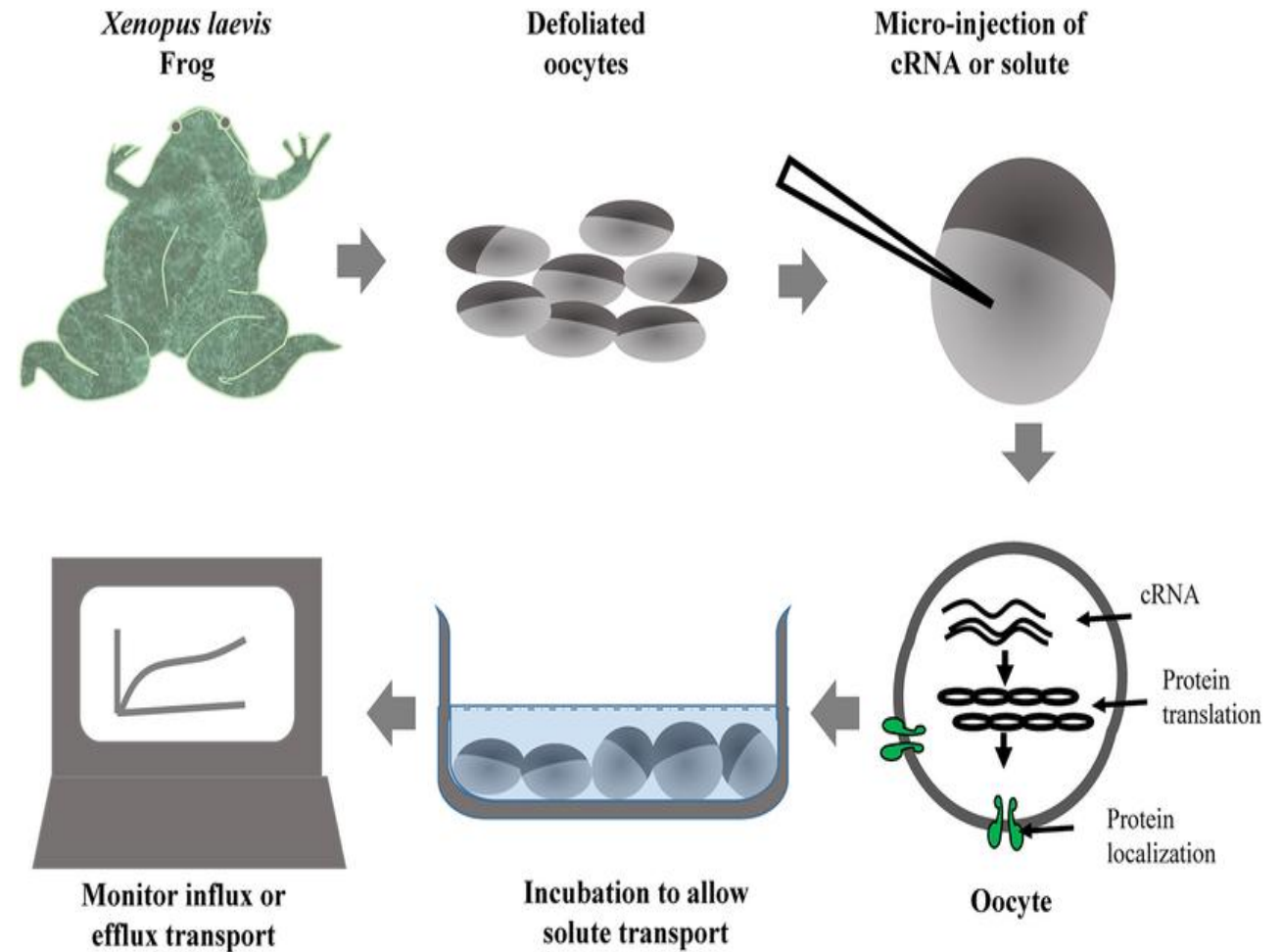
Eflujo o salida de sustrato

Evalúa la **salida de un sustrato pre-acumulado** desde ovocitos que expresan transportadores funcionales.

Se pueden utilizar Electrodo selectivos de ion (ISE)

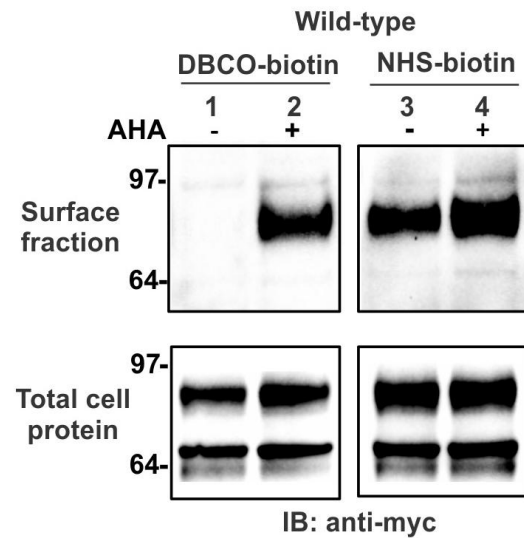
Ejemplos

- Electrodos de Na^+
- Electrodos de K^+
- Electrodos de Cl^-

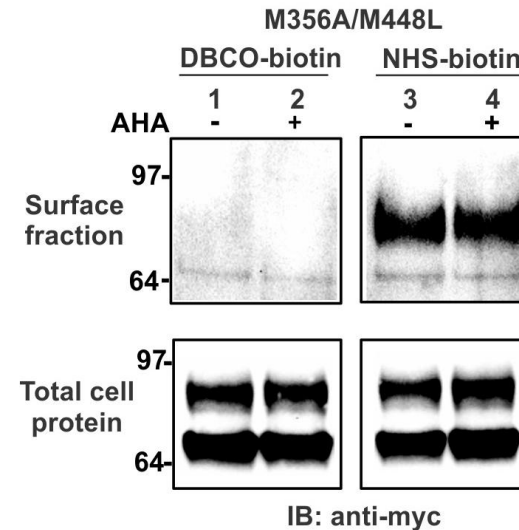


Biotinilación de proteínas de superficie

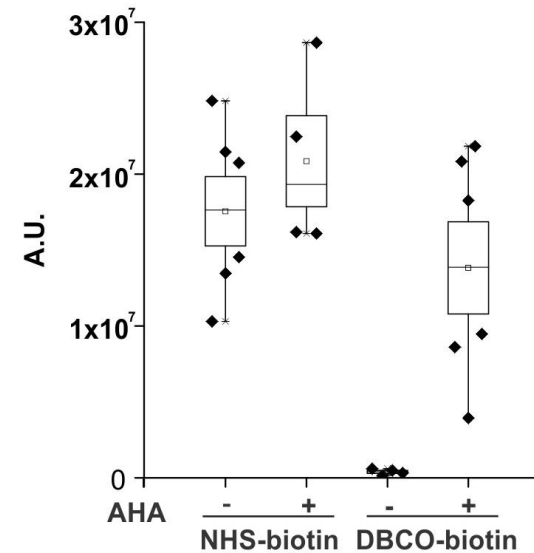
(E)



(F)



(G)



Methods in Enzymology 479 (2010): 185–211

Se usa para **marcar covalentemente proteínas expuestas en la superficie** del ovocito con biotina, de modo que luego puedan **aislarse o detectarse** (p. ej., por Western blot o ensayo de afinidad), cuantificando quién está en membrana.

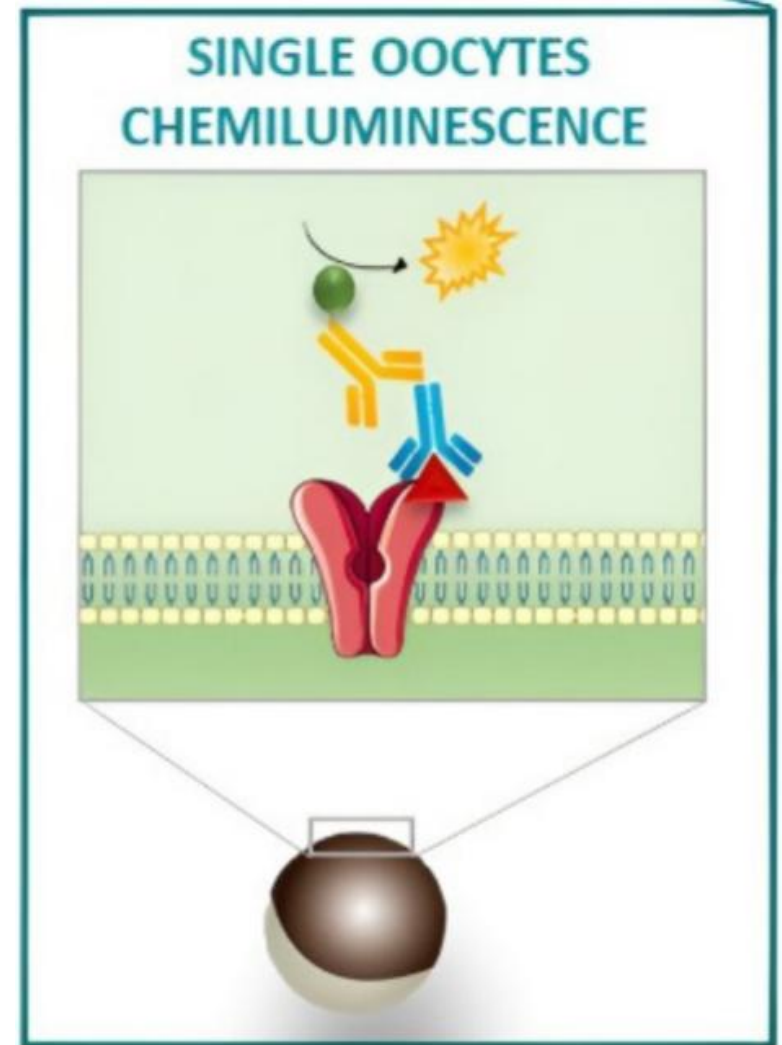
SOC — Single-Oocyte Chemiluminescence

SOC se utiliza para **cuantificar proteínas expresadas en la membrana plasmática** de oocitos **de forma no destructiva**, en **oocitos individuales** y con **alta sensibilidad**.

Es ideal para:

- Comparar **nivel de expresión en superficie** entre condiciones
 - Evaluar **efectos de mutaciones**
 - Ensayos **semi-high throughput** (placas multipocillo)
 - Correlacionar **expresión en membrana vs función (TEVC)**
- ☞ **No mide función**, mide **cantidad de proteína en superficie**.

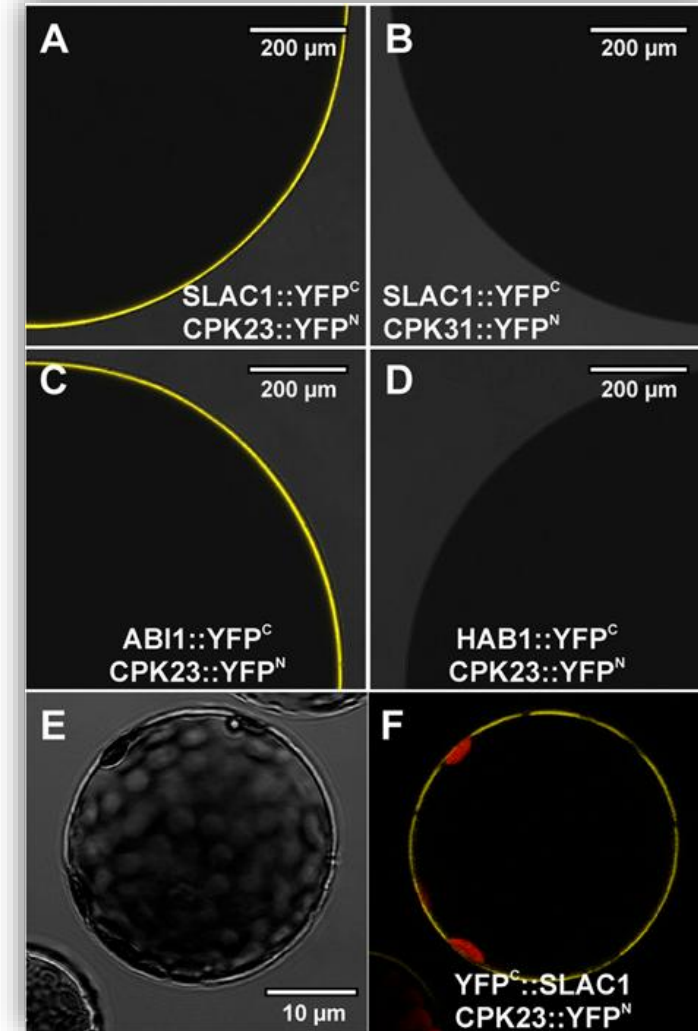
Se basa en anticuerpos y una reacción quimioluminiscente que es proporcional a la expresión en superficie.



BIFC (Biomolecular Fluorescence Complementation)

BIFC permite **visualizar interacciones proteína–proteína in vivo**, directamente en oocitos, indicando:

- si dos proteínas **interaccionan**
 - **dónde** interaccionan (membrana, citosol, compartimentos)
 - efecto de mutaciones sobre la interacción
- ☞ Muy potente para **canales multímeros**, transportadores y complejos reguladores.



GEIGER, D., et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no 17, p. 8023-8028.

Monitorización de la fluorescencia— Calcein y otros fluoróforos

¿Para qué sirve?

La monitorización fluorescente en oocitos se basa en **cargar la célula con un fluoróforo sensible** a un parámetro fisiológico (iones, pH, volumen, voltaje, etc.) y registrar cambios de fluorescencia como **lectura indirecta de la actividad de canales o transportadores**.

Fluoróforos más usados en oocitos y para qué sirven

Calcein: Quenching por metales (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , etc.)

Phen Green SK: Quenching específico por **iones metálicos divalentes**

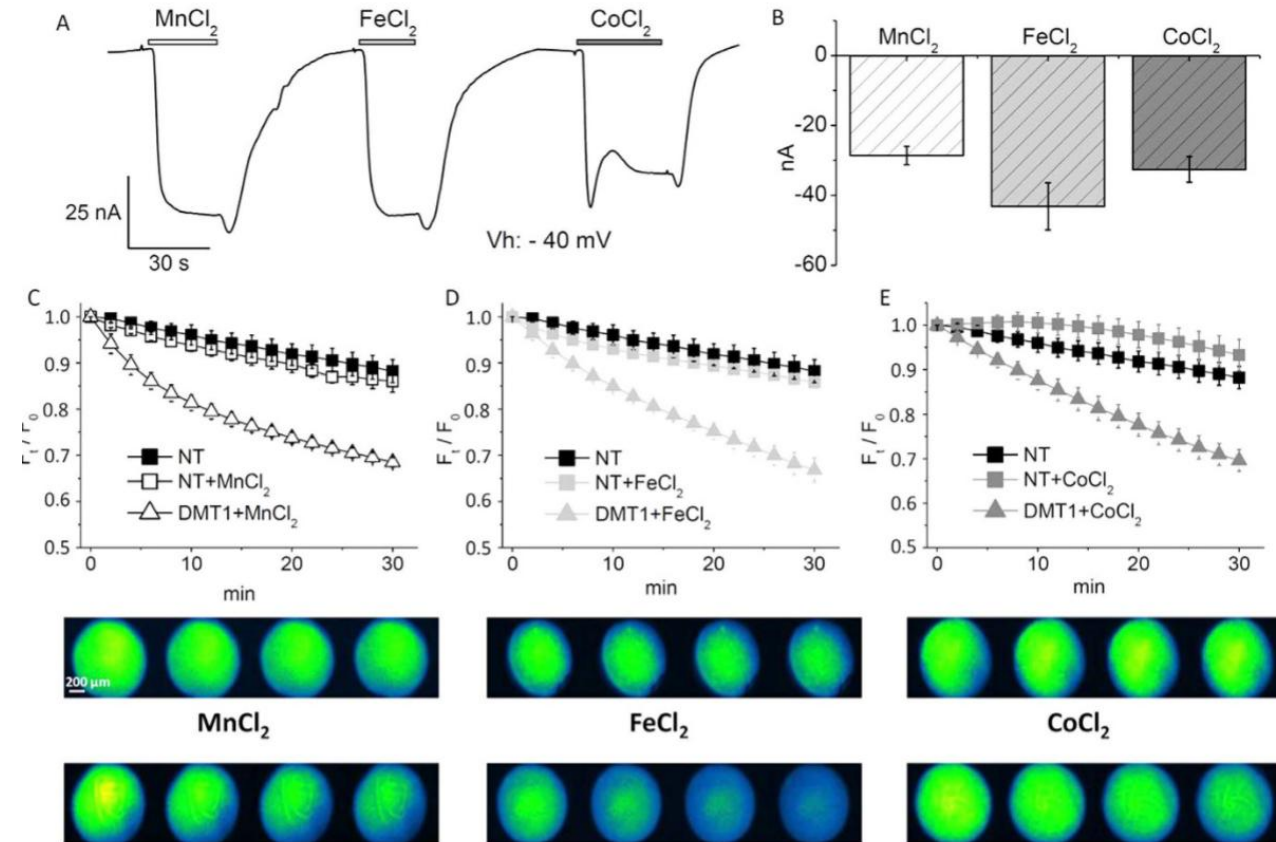
Fura-2 / Fluo-4: Ca^{2+} intracelular

BCECF: pH intracelular

BFI: Na^{+} intracelular

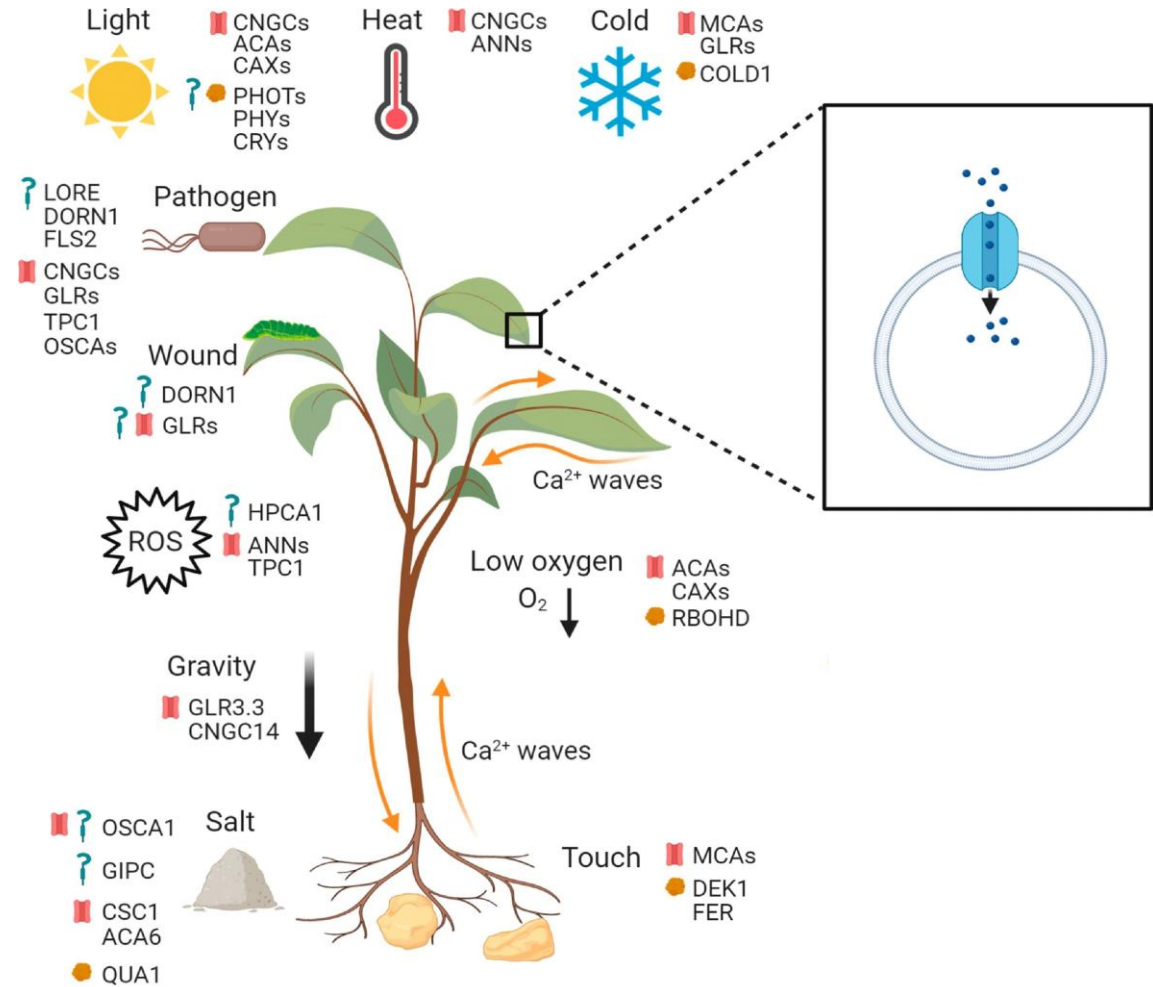
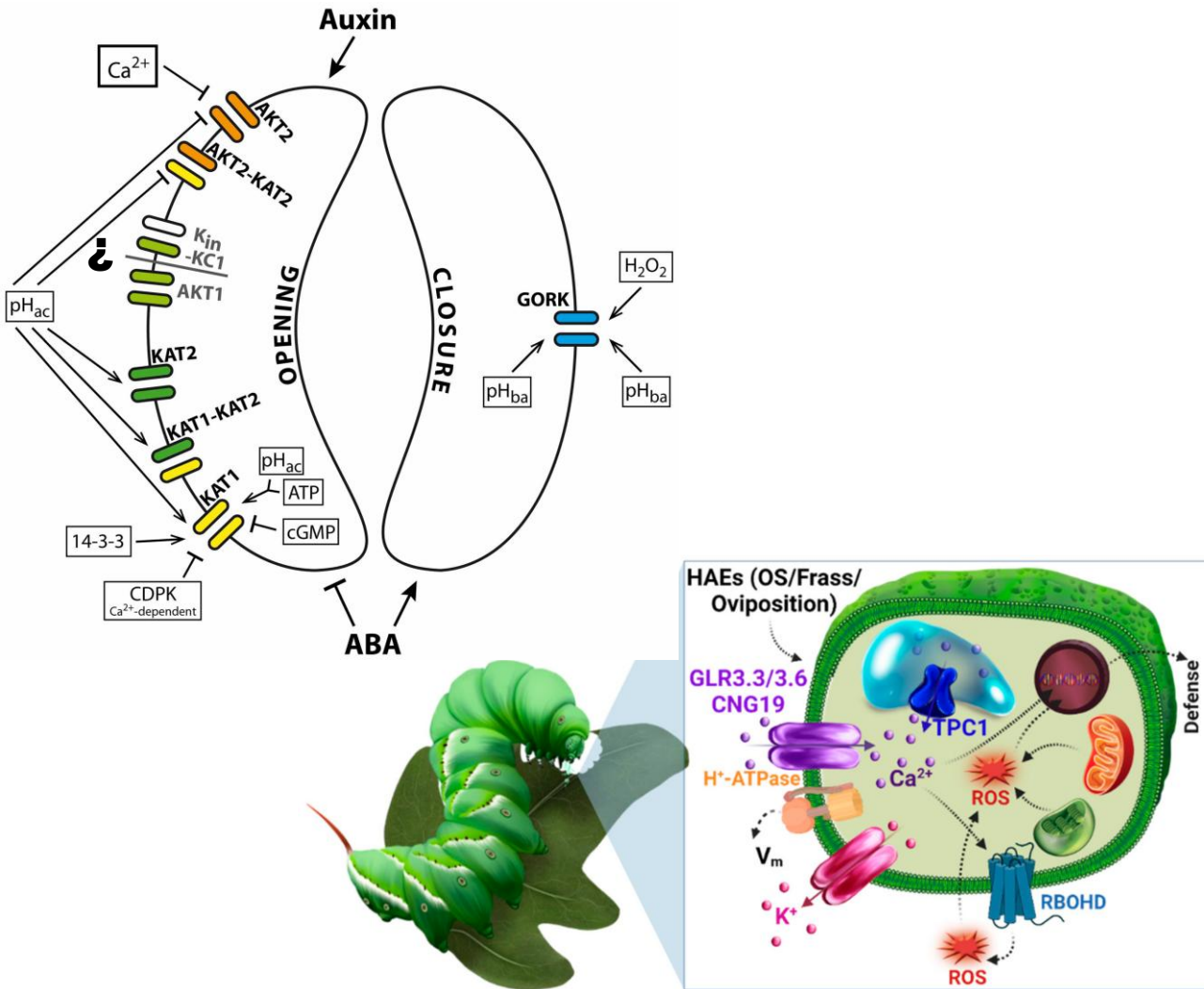
PBFI: K^{+} intracelular

MQAE: Cl^{-} intracelular (quenching dependiente de Cl^{-})



¿Por qué estudiar proteínas electrogénicas?

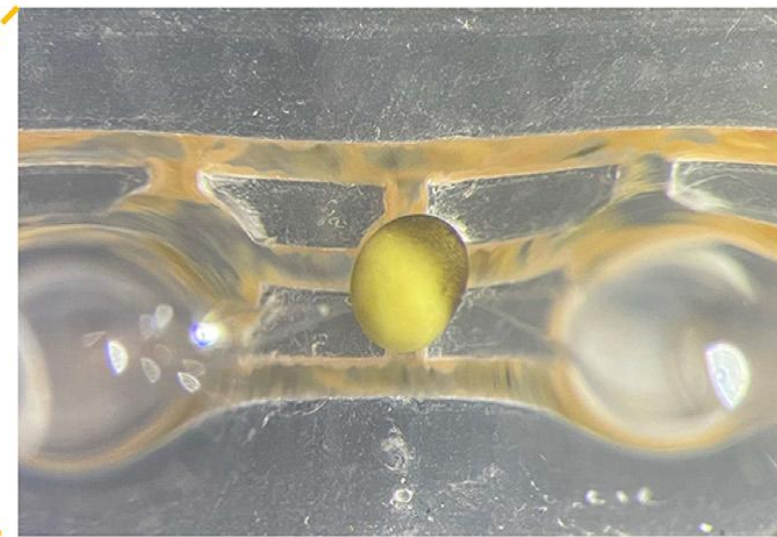
Los canales de iones son las **puertas eléctricas** que controlan casi todas las respuestas de las células vegetales: cómo crecen, cómo perciben el entorno y cómo se adaptan al estrés.



¿Cómo probar la función de canales o transportadores?

Voltage clamp- Two Electrode Voltage Clamp

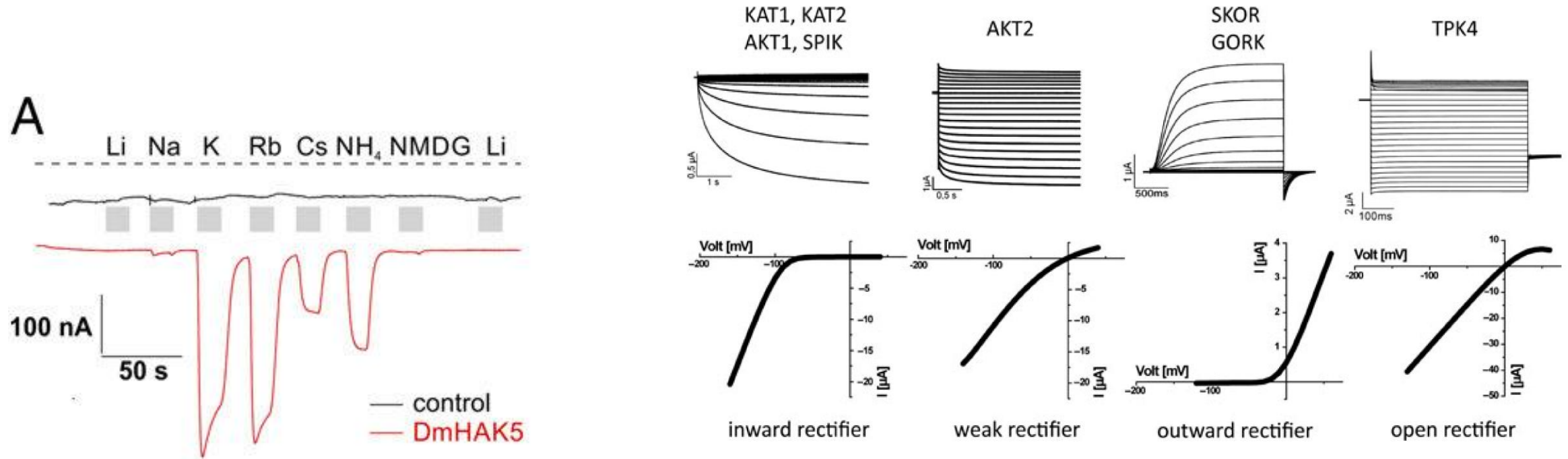
D TEVC recording experiment



Voltage clamp- Two Electrode Voltage Clamp

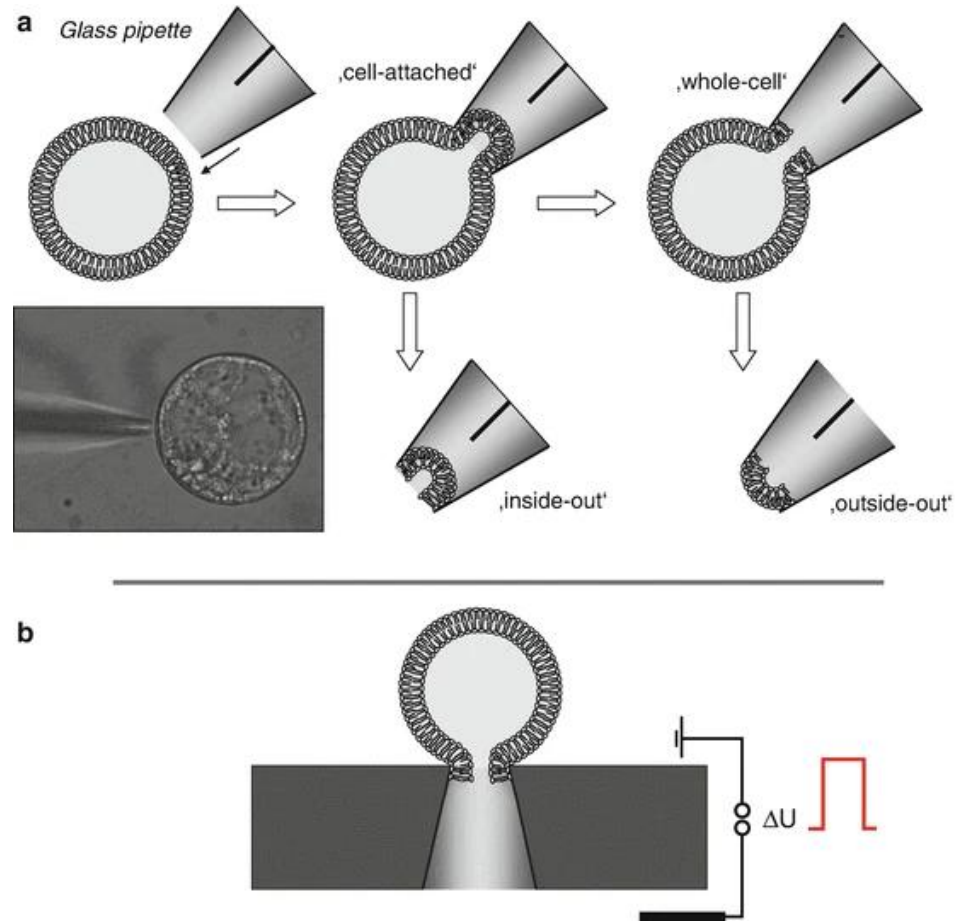
En un experimento TEVC se mide la **corriente total** de la membrana mientras se modifican el voltaje y/o las soluciones externas mediante perfusión.

Las corrientes reflejan cambios en el flujo electrogénico de iones.

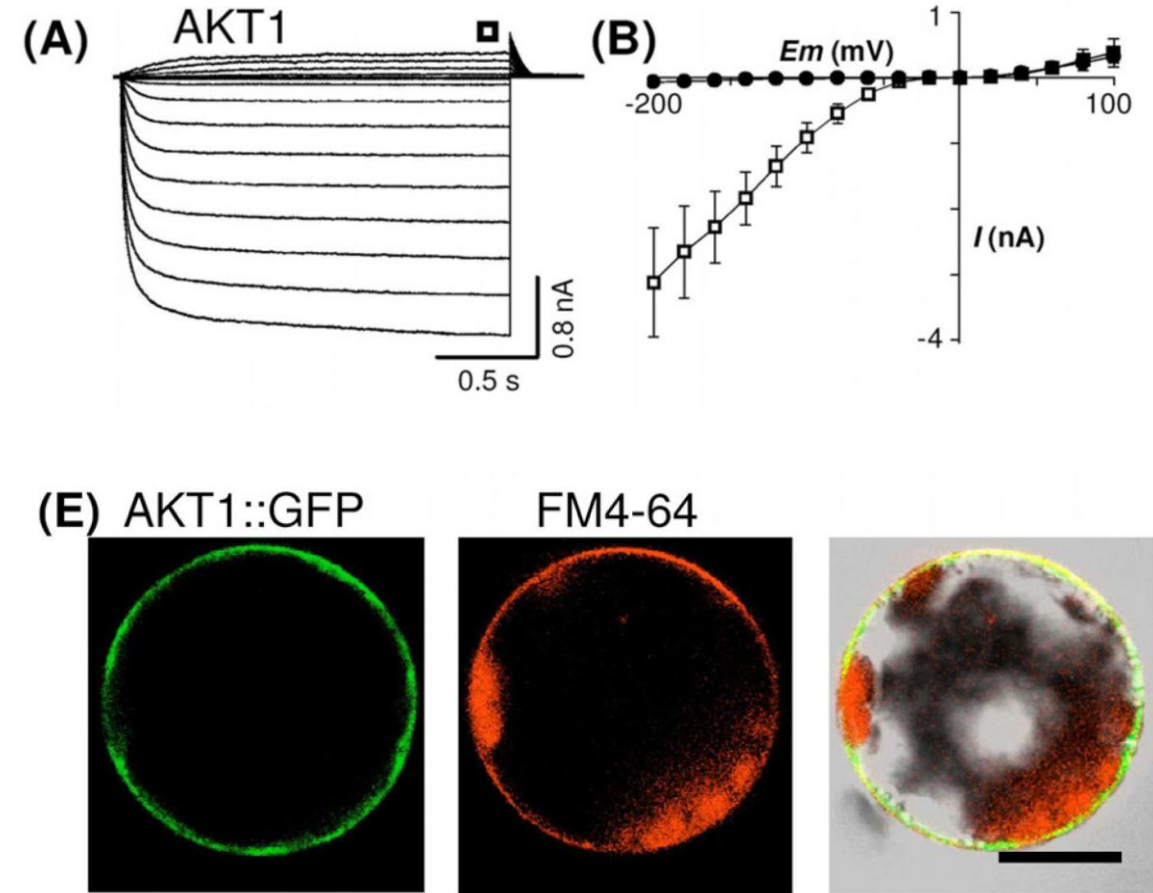


HEDRICH, Rainer; ANSCHÜTZ, Uta; BECKER, Dirk.. *The plant plasma membrane*, 2010, p. 253-274.

Voltage clamp- Patch Clamp



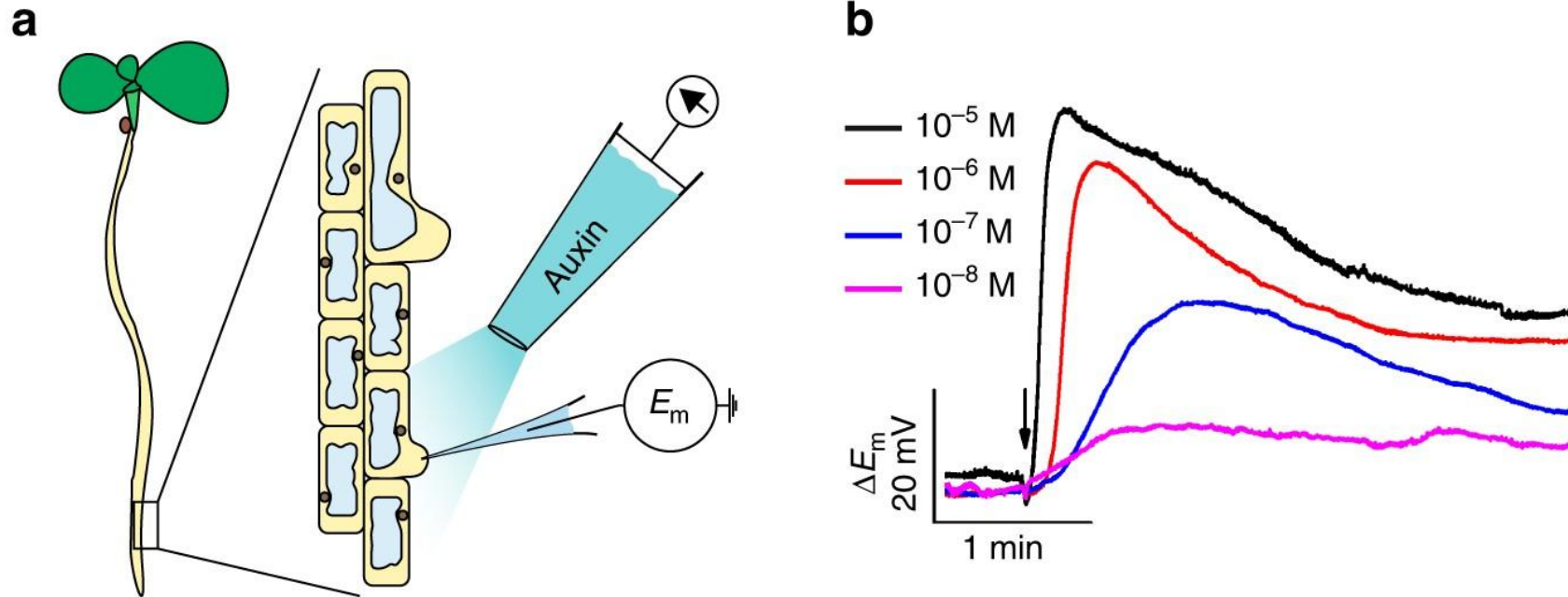
WEGNER, Lars H. *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham, 2016. p. 1-23.



HOSY, E., et al. *Plant Methods*, 2005, vol. 1, no 1, p. 14.

Medidas de transporte en plántulas intactas de Arabidopsis.

Las plantas **son sistemas eléctricamente activos**, y muchos procesos fisiológicos clave —como la señalización hormonal, el crecimiento, el transporte iónico o la adaptación ambiental— tienen una **firma eléctrica directa**.



Los experimentos que se muestran en los paneles **a y b** ilustran muy bien cómo la **variación del potencial de membrana (E_m)** puede medirse **in vivo**, en células vegetales intactas, y cómo esta señal eléctrica responde de forma rápida y dosis-dependiente a una hormona como la **auxina**.