UCH-FC
M86-B
V722

CARACTERIZACIÓN DE LAS VIAS DE ACCESO DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO DE MUSCULO ESQUELETICO DE RATA

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar
al grado de Magister en Ciencias
con mención en Fisiología

Facultad de Ciencias

por

ALFREDO ALBERTO VILLARROEL G.

Enero, 1986

Profesores guía : Osvaldo Alvarez
Ramón Latorre

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Magister de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Alfredo Alberto Villarroel Guerrero

ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en ciencias con mención en Fisiologia, en el examen de defensa de Tesis rendido el dia 17 de Enero de 1986.

Patrocinante de Tesis
Dr. Osvaldo Alvarez .....

Dr. Ramon Latorre .....

Comisión informante
de Tesis
Dr. Francisco Bezanilla .....

Dra. Cecilia Hidalgo .....

Dr. Enrique Jaimovich .....

Dr. Mario Luxoro .....

" Que cada trabajo sea un exito - "

A la memoria de

Mercedita.

AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos ...

Al Dr. Osvaldo Alvarez, por su infinita paciencia, y por haberme concedido el honor de ser su discipulo.

Al Dr. Ramon Latorre por su constante preocupación, aun desde lejos, por el exito de este trabajo.

A Juan Espinoza, por sus consejos, por su amistad, y por enseñarme todas aquellas cosas que no aparecen en los libros.

A la Dra. Cecilia Vergara, por su profundo espiritu critico, y por dedicar horas de su tiempo a largas y provechosas discusiones.

A la Dra. Ximena Cecchi, por iniciarme en los caminos de la ciencia, en arduas horas de DIMBOA.

A mis compañeros Andres, Ricardo, Carmen, David, Marcelo, y Claudio, por ayudarme en los momentos críticos y por su amistad.

A los amigos de toda una vida, Polo, Alejandra, y Fernando.

A mi esposa Lilian y a mi hijo Felipe por permitirme tomar parte de su tiempo para dedicarlo al presente trabajo.

A todas las innumerables personas, a quienes debo mucho y sin embargo no aparecen mencionadas.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS viii

LISTA DE FIGURAS ix

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS xii

RESUMEN xiv

ABSTRACT xvi

INTRODUCCION 1

Canales de potasio activados por calcio 3

Conducción de iones en solución 6

Cómo estudiar las propiedades estructurales estructurales de los canales de potasio 7

Ideas centrales en el bloqueo 8

Objetivos 16

TEORIA 17

Teoría de bloqueo 17

Procesos de dos estados 17

Bloqueo del canal como un proceso de dos estados 18

Efecto del potencial eléctrico sobre la la constante de disociación 19

¿ Que se dería esperar del bloqueo de un canal único ? 22

Filtros 25

Distribución de amplitudes de una señal filtrada 28

Valor esperado de corriente 31

Ruido inespecífico 32
METODOS 34
Visión global del método 34
Detalle experimental 38
Preparación de membranas de túbulo transverso 38
Membranas artificiales 40
Electrodos 40
Generador de pulsos 42
Lípidos 42
Incorporación de canales 44
Medición de corrientes 45
Grabación 50
Análisis de las corrientes 51
Visualización de los datos adquiridos 51
Curvas corriente voltaje 51
Filtro digital 52
Estimación de parámetros 55
Mediciones cinéticas 56
Construcción de histogramas de amplitudes 58
RESULTADOS 60
Bloqueo de corrientes 60
Antecedentes 60
Modos de bloqueo 60
Conclusiones 65
Competencia con potasio 66

Antecedentes 66
Acción de potasio 66
Conclusiones 69
Bloqueo por compuestos monovalentes 71
Antecedentes 71
Bloqueo desde el lado cis 71
conclusiones 75
Bloqueo por compuestos divalentes 78
Antecedentes 78
Bloqueo por iones divalentes 78
Conclusiones 83
Bloqueo por el lado trans 84
Antecedentes 84
Acceso trans 84
Conclusiones 87
Cinética de bloqueo 90
Antecedentes 90
Propiedades cinéticas 90
Conclusiones 100
DISCUSION 101
Orígenes del efecto del potencial eléctrico sobre el bloqueo 101
Acceso citoplasmático 103
Acceso trans 107
Arquitectura de las vías de acceso 109

Comparación con otros canales 111

Cinética de bloqueo 113

¿ Es posible entender la alta conductancia ? 115

Conclusión final 116

REFERENCIAS 118

APENDICE 122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Conductancia y selectividad para diversos canales ionicos. 5

Tabla 2. Desplazamiento del bloqueador po TEA debido a un aumento en la concentración de potasio en el lado trans. 70

Tabla 3. Parámetros de bloqueo para compuestos monovalentes agregados en el lado cis. 76

Tabla 4. Parámetros de bloqueo para diversos compuestos agregados en el lado trans. 88

Tabla 5. Comparación de los parámetros del bloqueo inducido por TEA (trans) medidos de la disminución de conductancia del canal y de histogramas de amplitudes. 97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de energía potencial para un ion en su entrada al canal 20

Figura 2. Interpretación del bloqueo de canal único. 24

Figura 3. Filtro RC. 26

Figura 4. Propiedades de la función densidad de probabilidad Beta. 30

Figura 5. Montaje experimental. 36

Figura 6. Cámara de teflón y electrodos. 41

Figura 7. Generador de pulsos. 43

Figura 8. Esquema del circuito de un conversor corriente voltaje y compensador de frecuencias. 46

Figura 9. Sistema de medición de corrientes. 49

Figura 10. Filtro digital simulado por un computador. 54

Figura 11. Acción de compuestos bloqueadores sobre la corriente a través del canal 61

Figura 12. Bloqueo por tetraetilamonio (TEA) 63

Figura 13. Experimento típico 64

Figura 14. Desplazamiento del bloqueo causado por un aumento en la concentración de K^+ en el lado <u>cis</u> 67

Figura 15. Liberación del bloqeo al aumentar la concentración de K^+ a ambos lados de la membrana 68

Figura 16. Acción de TEA sobre la corriente. 72

Figura 17. Estequiometría del ligamen de TEA. 73

Figura 18. Bloqueo causado por feniltrimetilamonio (FTMA) 74

Figura 19. Estructura de los compuestos BisQn y relacionados. 79

Figura 20. Constante Kd(0) para compuestos BisQn 80

Figura 21. Medida de zδ para para compuestos BisQn y relacionados. 82

Figura 22. Curva I/V en presencia de tetrametilamonio (TMA) puesto en el lado trans. 85

Figura 23. Bloqueo por TEA trans 86

Figura 24. Aumento de las fluctuaciones del canal abierto causadas por TEA agregado en el lado trans. 91

Figura 25. Histograma de amplitudes del ruido del canal abierto es ausencia de bloqueador. 92

Figura 26. Determinación de las constantes α y β 94

Figura 27. Variación de las constantes de ligamen β y de liberación α con el potencial 95

Figura 28. Histogramas de amplitudes a distintas concentraciones de TEA agregado en el lado trans 98

Figura 29. Variación de las constantes cinéticas β y α en función de la concentración de TEA 99

Figura 30. Perfil de potencial en las entradas del canal, determinados de los valores de zδ para los compuestos BisQn 108

Figura 31. Modelo de la región del canal donde cae el potencial. 110

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ATP	adenosina trifosfato
α	constante de liberación (ms^{-1})
α_o	α a potencial cero
B(a,b)	función beta (no confundir con f(y))
[B]	concentración milimolar de bloqueador
BisG8	n-octano-1,8-(guanidinio)
BisQn	n-alcano-1,n-N,N,N,N',N',N'-hexametil-<u>bis</u>-amonio
β'	constante de seudoprimerorden (ms^{-1})
β	constante de ligamen ($\beta=\beta'/[B]$)
β_o	β a potencial cero
C9	noniltrimetilamonio
A*B	convolución de A y B
E(y)	valor esperado de y
f(y)	funcion densidad de probabilidad beta
μF	microfarad (10^{-6} Farad)
Γ	funcion gamma
I	corriente en presencia de bloqueador (pA)
I_o	corriente en ausencia de bloqueador (pA)
I/V	Corriente-voltaje
Kd(V)	constante de disociación ($Kd=\alpha/\beta$)
K	constante de equilibrio ($K=\beta'/\alpha$)

MOPS	Acido 3-[-N-morfolino]propanosulfónico
n	número de grupos $-CH_2$ de divalentes.
Ω	Ohm (1 volt/1 ampere)
pA	picoampere (10^{-12} ampere)
P(a)	probabilidad del evento a
pS	picosiemens
R	constante de los gases
S	Siemens (1 ampere/1 volt)
σ	desviación estandar
T	temperatura absoluta
TEA	Tetraetilamonio
Tetrakis	Tetrakis(1-hidroximetil)amonio
TMA	Tetrametilamonio
V	potencial electrico aplicado (volts)
V_1	potencial a la salida del conversor I/V
V_0	potencial a la salida del compensador de frecuencias
zδ	distancia eléctrica
$z\delta_A$	zδ de la primera carga de BisQn
$z\delta_B$	zδ de la segunda carga de BisQn
$z\delta_1$	distancia eléctrica solución-pico
$z\delta_2$	distancia eléctrica pozo-pico
$z\delta_{Divalente}$	zδ experimental para divalentes $z\delta_{Divalente}=z\delta_A + z\delta_B$

RESUMEN

El canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético de rata es un canal representativo de los canales de alta conductancia activados por calcio. Estos canales son muy selectivos a potasio y a la vez de alta conductancia. Con el objetivo de determinar algunos aspectos de la morfología de la proteína, que le permiten tener características tan singulares, se ha estudiado la interacción de sales de amonio cuaternarias con el canal.
Los resultados obtenidos indican que :

Los cationes orgánicos son capaces de interactuar con el canal de un modo que es dependiente del potencial eléctrico, bloqueando la corriente que pasa a través del canal.

El bloqueador puede ser liberado aumentando la concentración de potasio en el mismo lado en que se agrega el bloqueador, en el opuesto, ó ambos, indicando que el bloqueo ocurre en el sistema de conducción.
De las características de los bloqueadores se muestra que el lado citoplasmático del canal es hidrofóbico, en cambio el lado extracelular es polar.

De las dimensiones de los compuestos usados como bloqueadores se puede determinar que el lado

citoplasmático posee una zona de acceso de a lo menos 0.5 nm de radio con una constricción abrupta a 1 nm de profundidad. El lado extracelular es de 0.3-0.4 nm de radio, el cual disminuye progresivamente hasta unos 0.2 nm a una profundidad de 1 nm.

Se estudia además la cinética de la reacción ligamen- liberación de TEA por el lado extracelular usando un análisis que considera las fluctuaciones de la conductancia del estado abierto. Los datos cinéticos indican que el bloqueador se liga en una reacción de seudoprimer orden con una energía de activación de 18 kT. Los resultados indican que el canal tiene dos grandes regiones de acceso y que la region de máxima resistencia es a lo más de 0.35 nm de largo.

ABSTRACT

The calcium activated K^+ channel from skeletal muscle is representative of calcium activated K^+ channels. These channels have both large conductance and high selectivity. In order to understand how these channel properties can coexist I have studied the interaction between quaternary ammonium compounds and the channel. These compounds have been used previously to probe the gross structural features of the ionic conduction pathways of other potassium channels.

Channels were incorporated into planar phospholipid bilayer membranes, and single-channel currents were measured in the precence of ammonium-derivatives cations in the aqueous phase. The main results are the following: Organic cations can block the the channel in a voltage dependent manner. When added to the cytoplasmic side all movovalent blockers appear to interact with a site located at 27 % of the electrical potential drop measured from this side.

The blockade can be relieved by increasing the K^+ concentration in the blocker's side, in the opposite side or in both, showing that the blocker occupies a site inside the K^+ conduction pathway.

The relation between blocker structure and affinity by the binding site indicates that the cytoplasmic side is hydrophobic but the extracellular side is polar.

The results lead to a picture of the channel containing a wide nonselective cytoplasmic opening of 1 nm in depth, followed by a narrow costriction smaller than 0.25 nm in diameter. The extracellular side presents an opening of 0.3-0.4 nm in radius that gradually decreases at 1 nm of depth.

Kinetic properties of blockade by TEA at the extracellular side were also studied by a method that considers the fluctuations of open state current. The kinetic data showed that the blocker binds according to a pseudo first order reaction, with an activation energy of 18 kT.

The above results indicate that the calcium activated K^+ channel has two large access sites, where approximately a half of the total voltage drops. These data predict that the region connecting the two access sites is a narrow pore shorter than 0.35 nm.

INTRODUCCION

La estructura común a toda membrana biológica es la de una doble capa de lípidos, con proteínas inmersas en ella. Según la posición que ocupan en la bicapa se distingue entre proteínas extrínsecas y intrínsecas (Singer y Nicolson, 1972). Las primeras interactúan sólo con una de las dos monocapas, en cambio las segundas son capaces de atravesarlas. Algunas proteínas intrínsecas, llamadas canales iónicos, se encargan de la conducción de partículas cargadas.

Algunos canales iónicos son más eficientes que otros en trasportar iones a través de la membrana. Como el trasporte de iones genera una corriente eléctrica, la medida de la eficacia en la conducción se expresa como la conductancia del canal, que es una relación entre la corriente y el potencial eléctrico necesario para generarla. La conductancia es el valor recíproco de la resistencia eléctrica, y se mide en Siemens (S). Un Siemens corresponde a la conductancia de un material que al aplicarle una diferencia de potencial de un volt, deja pasar una corriente de un ampere. Debido a que las conductancias de los canales iónicos son bajas, se prefiere usar la unidad de picosiemens (pS) que

corresponde a 10^{-12} S.

La membrana celular, como barrera al paso de substancias es altamente selectiva, esto quiere decir que deja pasar con mayor facilidad ciertas substancias más que otras. La selectividad de la membrana a los iones está dada por la selectividad de los canales que ésta contiene.

Los canales iónicos tienen la propiedad de variar aleatoriamente su conductancia entre varios estados discretos, que generalmente son dos, uno conductor, llamado abierto, y uno no conductor, llamado cerrado. El canal es capaz de modificar la corriente promedio que transporta, variando las probabilidades de transición entre los estados abierto y cerrado, en respuesta a diversos estímulos, como por ejemplo variación en la concentración de Ca^{2+}, de ATP, ó alguna droga, como la acetilcolina, ó cambio en el potencial de membrana. La propiedad de cada canal de modificar las probabilidades de apertura y cierre, en respuesta a los estímulos antes mencionados, es el modo como la célula modula las corrientes que circulan a través de la membrana plasmática. Los canales que aumentan su probabilidad de apertura en presencia de un compuesto químico (por ejemplo acetilcolina) se dice que son activados por (acetilcolina) ese compuesto. Los canales que modifican su probabilidad de apertura con el potencial se llaman

canales dependientes de potencial.

Esta última propiedad, junto con la selectividad, constituyen la base de la excitabilidad celular.

Canales de potasio activados por calcio.

Se ha descrito canales de potasio activados por calcio en membranas provenientes de diversos orígenes. Algunas de éstas son : células musculares de rata en cultivo, (Blatz y Magleby, 1984); membrana basolateral del acino de la glándula salival, en rata (Maruyama y col., 1983); células disociadas de músculo liso, (Singer y Walsh, 1984); línea de células provenientes de la pituitaria anterior, (Wong y Lecar, 1982); membranas aisladas de túbulo transverso de músculo de conejo, (Vergara y Latorre., 1983 ; Latorre y col. 1982); músculo liso de conejo (Cecchi y col, 1985); células cromafines de bovino (Yellen, 1984).

Todos estos canales, llamados de alta conductancia, para distinguirlos de los canales de potasio "clásicos" (vease más adelante), comparten numerosas propiedades, algunas de estas son las que se detallan a continuación :

1) Son activados por calcio, esto quiere decir que el aumento en la concentración de calcio en la cara citoplásmatica del canal produce un aumento en la fracción de tiempo abierto.

2) Tienen una conductancia extraordinariamente alta, de modo que son capaces de transportar una gran cantidad de iones en poco tiempo.

3) Son muy selectivos a potasio. La conductancia para este ion es mucho mayor que para otros cationes alcalinos.

Lo extraordinario de las características de conducción de estos canales se desprende de la comparación de sus propiedades con las de otros canales de potasio conocidos, y de examinar las leyes que gobiernan la conducción eléctrica en medio acuoso. La hipótesis básica es que los canales constituyen poros a través de los cuales circulan los iones.

La tabla 1 muestra las propiedades de conducción de tres grupos de canales iónicos a saber, selectivos, no selectivos y de alta conductancia activados por Ca^{2+}. La tabla 1 muestra un hecho bastante general; que los canales selectivos tienen baja conductancia y los canales de alta conductancia no son selectivos. Los canales de potasio de alta conductancia parecen constituir un grupo aparte. Para que un canal tenga alta conductancia debería tener un diámetro grande, mucho más grande que el diámetro del ion, para que sea eficiente en la conducción, reciprocamente, para que opere algún mecanismo de selectividad se requiere

Tabla 1

Conductancia y Selectividad
para diversos canales iónicos.

Preparación	Condición	pS	Selectividad
	canales de potasio.		
Axón de jibia	10 K_o/400 K_i	12	$K^+ > Rb^+ > NH4^+$
Huevo de tunicado	100 K_o/400 K_i	7	$Tl^+ > K^+ > Rb^+$
Neurona de Hélix	100 K^+	2	$Tl^+ > K^+ > Rb^+$
Eritrocito	100 K^+	18	$K^+ >> Na^+$
	canales no selectivos		
Hemocianina	100 K^+	200	$K^+ > Na^+ > Cl^- > Li^+$
Porina (*E. coli*)	100 Na^+	140-480	No
Porina mitocondrial	100 K^+	450	No
	Canales de K^+ activados por Ca^{++}		
Túbulo T	100 K^+	230	
Músculo liso	100 K^+	230	
Cel. cromafines	140 K^+	180	$Tl^+ > K^+ > Rb^+ >> Cs^+$
Miotubos	140 K^+	187	
Pituitaria	145 K^+	208	

Tabla modificada de Latorre y Miller (Latorre y Miller, 1983) Las concentraciones iónicas son milimolares. K_i, concentración de potasio intracelular, K_o concentración de potasio extracelular, K^+ concentración de potasio en condiciones simétricas.

una interacción estrecha entre el ion y la proteina, pero este último requisito no es compatible con un poro de gran diámetro.

Conducción de iones en solución.

La conducción de iones en solución está caracterizada por la conductividad eléctrica, que es la conductancia de un cilindro de 1 cm^2 de sección, 1 cm de longitud y concentración 1 M. Para una solución de KCl de concentración 100 mM su valor es de 1.28 10^{-2} $\Omega^{-1}cm^{-1}$. Supongamos que el canal tuviera 5 nm de largo, que es el espesor de una membrana típica, y que su radio fuera 0.18 nm, el radio del Cs^+, el más grande de los cationes alcalinos, entonces el canal tendría una conductancia de 26 pS. Para que el poro tenga una conductancia de 230 pS, conductancia de los canales de potasio de alta conductancia activados por calcio, su radio debería ser de 0.53 nm, es decir podría conducir una molécula tan grande como glucosa, luego no serían selectivos.

Hasta este punto, parece imposible entender las características de conducción de los canales de potasio de alta conductancia activados por Ca^{2+}, suponiendo que estos tienen la estructura de un simple poro. Se esperaría que el canal tuviera una estructura más compleja, en la que

sólo pequeñas zonas de la proteina tomen contacto estrecho con el ion y proporcionen la selectividad, y amplias zonas externas que constituirian las vias de acceso del ion al poro, donde el ion se conduciria como en la solución.

Hille habla de "filtro de selectividad" para referirse a la sección más estrecha del canal (Hille, 1984). En los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia, se ha propuesto que el filtro de selectividad deberia ser una parte muy pequeña del total de la via de conducción, y el resto de la via de paso deberia estar constituida por zonas muy amplias, es decir muy conductoras (Latorre y Miller, 1983).

Las observaciones anteriores plantean la necesidad de un estudio detallado de las caracteristicas de las vias de acceso al canal para determinar que caracteristicas tiene el poro tal que le permiten al canal tener alta conductancia sin que deje de ser selectivo.

Como estudiar la propiedades estructurales de los canales de K^+.

La arquitectura de un canal iónico es muy difícil de estudiar usando los métodos corrientes de determinación de estructuras de proteinas. Las dificultades surgen en el poceso de purificación, durante el cual las proteinas de

membrana, generalmente, pierden su conformación nativa al retirarlas del ambiente lipídico. Por otra parte los canales iónicos constituyen una fracción muy pequeña del total de las proteinas celulares.

Un método para dilucidar las caracteristicas estructural de un canal iónico, particularmente de la región que tiene que ver con el trasporte de iones, es estudiar la interacción de la proteina con moléculas que interfieren con la conducción. Estas moléculas se denominan bloqueadores, y son capaces de alterar la corriente que circula a través del canal.

El compuesto más usado para bloquear las corrientes de potasio es el tetraetilamonio. Este compuesto tiene un tamaño muy parecido al del potasio hidratado. Se cree que a este hecho se debe su propiedad de bloquear una gran variedad de corrientes de potasio en las preparaciones más diversas (Stanfield, 1983).

Ideas centrales en el bloqueo.

El fundamento del bloqueo es sencillo. El hecho que una molécula sea capáz de penetrar al interior de un canal demuestra la existencia de una cavidad de tamaño igual o mayor que esa molécula. Esta es la idea central que se ha usado para explorar aspectos estructurales de canales iónicos usando bloqueadores. Otros puntos de vista

complementarios son la dependencia de potencial eléctrico del bloqueo y la relación entre los grupos químicos del bloqueador y su afinidad por el canal. Si en el poro se establece un campo eléctrico la energía del ion bloqueador variará más con el potencial aplicado cuanto más profundo penetre éste en el campo. Este cambio en la energía de unión se manifestará como una afinidad dependiente de potencial, que será una medida de la "profundidad" a la que penetra el bloqueador.

La relación entre la afinidad del bloqueador por el sitio de ligámen y los grupos químicos que el compuesto posee indica qué tipo de interacciones hace éste con el canal, y por tanto da una idea de la constitución del sitio de ligamen.

El canal de potasio de axón de jibia (Armstrong, 1975) y el canal de potasio del retículo sarcoplásmico (Miller, 1982a), son dos canales en que se ha estudiado la estructura de las vías da acceso, usando bloqueadores. Armstrong (Armstrong, 1975) estudió la inactivación de las corrientes de potasio, en axón, causadas por derivados del TEA puestos dentro de la célula. Cuando se registraron las corrientes de potasio, en presencia de derivados de TEA. Se encontró que había más inactivación de la corriente cuanto más hidrofóbico era el derivado, y que la corriente

original se recuperaba al hiperpolarizar la célula. Con estas observaciones se planteó un modelo en que la corriente de potasio circula a través de un poro, que en su cara interna tiene una zona hidrofóbica, que puede acomodar la parte apolar del TEA.

El canal de potasio de axón también ha sido ampliamente estudiado por R. French (French y Shoukimas, 1981, 1985). French examinó las corrientes macroscópicas de potasio (corriente llevada por un gran número de canales), en condiciones de potencial controlado. Al estudiar la relación corriente voltaje instántanea vió que el bloqueo era dependiente de potencial, esto es, el bloqueador era más efectivo al poner potenciales despolarizantes.

El modelo para el bloqueo dependiente de potencial ha sido desarrollado por Woodhull (Woodhull, 1973). Según este modelo un ion bloqueador puede unirse a un sitio en el canal e impedir la conducción. Cuando el ion bloqueador deja el canal el proceso de conducción es normal, es decir un bloqueo del tipo todo o nada. Las suposiciones fundamentales de este modelo son :

-Los canales considerados en el modelo están abiertos, no interesa cómo los canales se abren y se cierran, sólo cuenta la fracción de canales abiertos que han sido

bloqueados.

-Otros iones no interfieren con la unión del bloqueador a su sitio.

Según la teoría de velocidad absoluta de reacción (Glasstone, 1947) la velocidad de ligamen, y la velocidad de liberación del bloqueador del sitio son funciones exponenciales del potencial de membrana.

Con estas suposiciones Woodhull desarolló una expresión para la corriente en presencia del bloqueador, suponiendo además que éste no es capáz de trasportar corriente a través del canal. La expresión es la siguiente :

$$I = I_o/(1 + [B]/Kd(0)\exp(z\delta FV/RT)) \qquad 1$$

en que I es la corriente en presencia del bloqueador, I_o en ausencia de éste, [B] la concentración de bloqueador, Kd(0) la constante de disociación del bloqueador del sitio de ligamen a potencial cero, y $z\delta$ la fracción del potencial, V, que afecta la energía del ion bloqueador en el sitio de ligamen. Si el potencial cae linealmente a lo largo del poro, una fracción del potencial equivale a una fracción de distancia, por lo que al parámetro $z\delta$ se le llama comunmente distancia eléctrica o valencia efectiva de bloqueo (véase figura 1).

French (French y Shoukimas, 1981) usó la teoría de bloqueo de Woodhull para interpretar sus datos. Su

postulado era que si el canal de potasio era un poro con las características indicadas por Armstrong (Armstrong, 1975), al bloquear la corriente usando N-alquil amonios de distinto tamaño sería capaz de encontrar un compuesto lo suficientemente grande que no bloqueara. Sin embargo French y Shoukimas, (1981) encontraron que la afinidad de los N-alquil amonios aumenta conforme aumenta el tamaño del compuesto, lo que le sugiere una gran zona hidrofóbica en la entrada al canal. El compuesto de mayor tamaño usado por French es es el tetrapentilamonio, cuyo diámetro es ~0.12 nm, esta es una estimación del límite inferior del tamaño del acceso al canal. Por otra parte encontró que los derivados con grupos polares eran capaces de penetrar más en la vía de conducción, como si el interior del poro fuera particularmente polar.

El primer y único estudio de la arquitectura de una de las dos vías de acceso, usando bloqueadores, en canal individual, a diferencia de los anteriores, hechos midiendo las corrientes macroscópicas, fue realizado por Miller y colaboradores (Coronado y Miller, 1980; Miller, 1982a), en el canal de potasio del retículo sarcoplásmico. En este canal, una gran cantidad de compuestos orgánicos, del tipo aminas y guanidinas son capaces de reducir la corriente que circula por el estado abierto del canal de un modo dependiente de potencial. Por analogía con el

modelo de Woodhull, se interpretó esto como una expresión del equilibrio entre el bloqueador y su sitio de ligamen (Coronado y Miller, 1979). De la reducción de la corriente se calculó Kd y la distancia electrica zó. Estos autores encontraron que todos los compuestos probados bloqueaban con una misma distancia eléctrica zó, indicando que se ligan en un sitio localizado en la misma posición en el campo eléctrico establecido a través de la membrana. Esta observación les sugirió que el canal poseia una entrada grande seguida de un poro estrecho. Miller desarrolló una técnica (Miller, 1982a) para medir la profundidad de esta vía de acceso usando, como bloqueadores, sales de amonio cuaternarias divalentes de estructura $(CH_3)_3\overset{+}{N}(CH_2)_n\overset{+}{N}(CH_3)_3$ con diversos valores de n (BisQn). Miller postuló (Miller, 1982a; Miller, 1982b) que si el efecto del potencial sobre el bloqueo se debe a la penetración de carga eléctrica en el campo eléctrico éste será mayor cuanto más carga penetre o cuanto más penetre en la vía de conducción. Por lo tanto los compuestos BisQn, por el hecho de tener dos cargas, deberian bloquear con una dependencia de potencial mayor que la encontrada para compuestos monovalentes equivalentes (N-trimetil n-alcano).

FACULTAD DE CIENCIAS BIBLIOTECA CENTRAL U. DE CHILE

Miller demostró posteriormente que esto efectivamente era correcto, aún mas, para un valor de n suficientemente grande encontró que la dependencia de potencial es igual a la de los compuestos monovalentes, como si la segunda carga del amonio no penetrara el campo eléctrico, el largo de este compuesto corresponde entonces a la profundidad del poro (Miller, 1982a).

Esta técnica de usar los compuestos BisQn como bloqueadores también permite determinar el potencial en función de la distancia. La hipótesis clave se basa en que todos los compuestos monovalentes bloquean con igual dependencia de potencial, es decir se ligan al mismo sitio. Con esta hipótesis, se puede postular que una de las dos cargas de los compuestos BisQn siempre se unirá al mismo sitio al que se unen los compuestos monovalentes. La segunda carga quedará a una distancia exactamente igual al largo de la cadena del compuesto del sitio de ligamen para compuestos monovalentes. Así la dependencia de potencial para compuestos divalentes será igual a la suma de los $z\delta$ de las dos cargas. La relación entre el valor de $z\delta$ observado ($z\delta_{Divalente}$) y las distancias eléctricas de cada una de las cargas ($z\delta_A$ y $z\delta_B$) es :

$$z\delta_{Divalente} = z\delta_A + z\delta_B \qquad 2$$

Por lo tanto al medir el efecto del potencial sobre el bloqueo causado por los compuestos BisQn, y conocido $z\delta_A$,

se puede determinar $z\delta_{b}$, que es la fracción del potencial a una distancia igual al largo de la cadena del sitio de ligamen para compuestos monovalentes.

Repitiendo esta medición para una serie de compuestos Bis_{n} Miller logró determinar el potencial en función de la distancia en uno de los accesos del canal de potasio de reticulo sarcoplásmico (Miller, 1982a).

Estos ejemplos dan una idea del tipo de información estructural que se puede obtener del bloqueo de la corriente que pasa a través de los canales de potasio, usando amonios cuaternarios. Ademas muestran que es razonable la hipótesis de accesos grandes para explicar las caracteristicas singulares de conducción de los canales de potasio de alta conductancia, ya que este tipo de estructuras pueden existir, como ha sido demostrado para otros canales de potasio.

OBJETIVOS

El canal de potasio activado por Ca^{2+} es un canal representativo de los canales de alta conductancia, tiene una alta selectividad a potasio, y una gran conductancia. Estas características de conducción son incompatibles con la estructura de un poro acuoso de diámetro uniforme. Los objetivos de esta tesis son estudiar las características de las vías de acceso a iones, que permiten al canal tener una alta conductancia sin perder las propiedades de selectividad. Los objetivos específicos son los que se detallan a continuación :

1) Demostrar que los cationes orgánicos bloquean por oclusión de la vía de conducción.
2) Estudiar la hidrofobicidad de los accesos, de modo de determinar la características electrostáticas del medio en que se mueven los iones.
3) Estimar las dimensiones de los accesos del canal, estudiando el bloqueo para amonios cuaternarios de distinto tamaño y forma.
4) Estudiar el proceso cinético de ligamen-liberación del bloqueador y determinar el perfil de energía potencial para los iones en los accesos.

TEORIA

Teoría de bloqueo

En esta sección se muestran los fundamentos teóricos de las ecuaciones usadas para analizar el bloqueo de canal individual. Estas son las que predicen la disminución de la corriente y la forma del histograma de amplitudes.

Procesos de dos estados

En esta parte se muestra cual es la probabilidad de encontrar uno de los dos estados en el equilibrio (Hodgkin y Huxley, 1952 ; Colquhoun y Hawkes, 1977; Colquhoun y Hawkes, 1983).

Consideremos un proceso de dos estados O y B. Sea β' la probabilidad de transición por unidad de tiempo que O se transforme en B, y α la probabilidad por unidad de tiempo que B se transforme en O. El esquema cinético para este proceso es el siguiente :

$$O \underset{\alpha}{\overset{\beta'}{\rightleftharpoons}} B \qquad 3$$

Si suponemos que las probabilidades de transición por unidad de tiempo son independientes del tiempo se tiene que las velocidades de transición estan dadas por las siguientes ecuaciones (Colquhoun y Hawkes, 1977) :

$$dP(O)/dt = \alpha P(B) - \beta' P(O) \qquad 4a$$

$$dP(B)/dt = \beta' P(O) - \alpha P(B) \qquad 4b$$

Aqui P(O) es la probabilidad de estar en O, y P(B) es la

probabilidad de estar en B, luego P(O) y P(B) estan relacionados según :

$$P(O) + P(B) = 1 \qquad 5$$

En el equilibrio (un tiempo muy largo despues de hacer una perturbación) las derivadas con respecto al tiempo se anulan, luego se tendrá que :

$$P(B_{eq.})/P(O_{eq.}) = \beta'/\alpha = K \qquad 6$$

A la razón K se le llama constante de equilibrio del proceso. La probabilidad de O en el equilibrio se obtiene de (5) y (6) :

$$P(O_{eq.}) = (1 + \beta'/\alpha)^{-1} = (1 + K)^{-1} \qquad 7$$

Es decir la probabilidad de O en el equilibrio queda completamente caracterizada por la constante de equilibrio K. Este hecho es general para cualquier proceso de dos estados.

Bloqueo del canal como un proceso de dos estados.

Si suponemos que el proceso cinético de ligamen y de liberación del bloqueador es un proceso de dos estados, en que O es el estado abierto y B el bloqueado, la probabilidad por unidad de tiempo, β', que el canal se bloquee dependerá de la concentración de bloqueador (por analogía con las reacciones químicas de seudo primer orden). En este caso el esquema cinético es :

$$O \underset{\alpha}{\overset{\beta'}{\rightleftharpoons}} B \qquad 8a$$

$$\beta' = \beta[B] \qquad 8b$$

En este caso llamaremos a la razón α/β constante de disociación (la denotaremos por Kd). Ahora P(O) es la probabilidad que el canal no esté bloqueado. Claramente $P(O_{eq.})$ dependerá de la concentración de bloqueador [B]. La expresión es la siguiente :

$$P(O_{eq.}) = (1 + [B]/Kd)^{-1} \qquad 9$$

Efecto del potencial eléctrico sobre la constante de disociación.

Si el ion bloqueador penetra en el campo eléctrico de la membrana, se esperará que la constante de disociación dependa del potencial eléctrico. El potencial puede favorecer el ligamen estabilizando el ion en el sitio, o desestabilizarlo al aumentar la energía del ion en el sitio.

Consideremos una membrana de espesor d y un sitio de ligamen a una distancia δd medido desde el lado 1 (fig.1). Analicemos como actúa el bloqueador puesto en el lado 1. Todas las distancias se expresaran como una fracción δ de la distancia total d, y el espesor de la membrana será 1. El pozo de energía potencial estará a una distancia δd del lado 1. Llamemos δ_1 a la posición del máximo de la barrera de energía medido desde el lado 1, y δ_2 a la distancia desde el máximo de la barrera de energía al sitio de

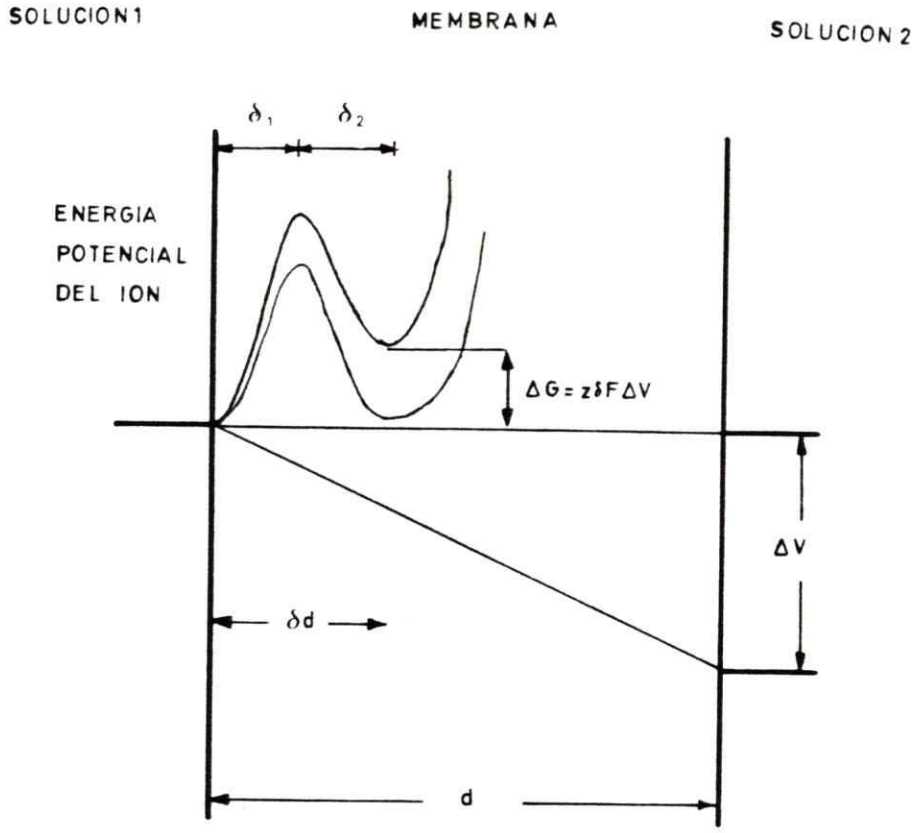

Figura 1
Perfil de energía para un ion en su entrada al canal.

Una fracción δ del potencial afecta al ligamen. En estas condiciones el corrimiento del pozo de energía potencial es $z\delta F\Delta V$ si ΔV es la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana. Obsérvese que la fracción δ corresponde a una fracción de la distancia cuando se conoce como varía el potencial a lo largo del poro.

ligamen. La probabilidad que el bloqueador entre al sitio depende de la diferencia de energia entre el lado 1 (solución) y el máximo de la barrera de energia potencial, y la probabilidad de salida del bloqueador depende de la diferencia de energia entre el sitio y el máximo de la barrera.

Si se produce un cambio en el potencial eléctrico de magnitud ΔV en el lado 1, referido al lado 2, lado en que definimos el cero de potencial, el cambio de potencial que se produce a la distancia δ_1 es $\delta_1 \Delta V$. Si el ion tiene valencia z, el cambio de energia potencial que experimenta el ion a la distancia δd es $z\delta_1 F\Delta V$.

Luego la probabilidad por unidad de tiempo que el ion entre al sitio va a depender del potencial:

$$\beta = \beta_o \exp(+z\delta_1 FV/RT) \qquad 10$$

Por un razonamiento análogo se obtiene la probabilidad por unidad de tiempo de salida del sitio de ligamen en función del potencial:

$$\alpha = \alpha_o \exp(-z\delta_2 FV/RT) \qquad 11$$

Asi el efecto del potencial sobre la constante de equilibrio es :

$$Kd = Kd(0)\exp(+z\delta FV/RT) \qquad 12a$$

$$\delta = \delta_1 + \delta_2 \qquad 12b$$

$$Kd(0) = \alpha_o/\beta_o \qquad 12c$$

Esta última ecuación nos dice que al aumentar el potencial

en el lado 1 se facilita la entrada del bloqueador y se dificulta su salida.

Observemos que, por simplicidad, se supuso que el potencial cae linealmente a lo largo del poro. Esto puede no ser asi, en este caso zó es la fracción del potencial total aplicado que modifica el pozo de energía para el ion en el sitio de ligamen. Haciendo esta salvedad en lo sucesivo se llamará a zó simplemente distancia eléctrica.

¿ Que se debería esperar del bloqueo de un canal único ?

En el bloqueo de la corriente a través de un canal individual se observa una disminución de ésta causada por el bloqueador. Si el bloqueo es un proceso de dos estados, y las probabilidades por unidad de tiempo de ligamen y liberación del bloqueador son β' y α respectivamente, esperaríamos que el canal se abra, fluctúe entre el estado abierto y bloqueado y luego se cierre. Este tipo de bloqueo fue observado por Neher y Steinbach (Neher y Steinbach, 1978) en el receptor de acetilcolina, usando como bloqueador un derivado de la lidocaina.

Si los tiempos medios de permanencia son muy cortos, es decir las constantes α y β son muy grandes, el sistema de medición no alcanza a captar las transiciones entre dos estados definidos de conductancia, sino que registra una disminución aparente de la corriente que pasa a través del

canal. A menudo se analiza esta disminución con las mismas ecuaciones desarrolladas para el bloqueo de la corriente macroscópica aunque los mecanismos que la producen son distintos para corriente macroscópica y corriente a través de canal único.

En el bloqueo de la corriente macroscópica la disminución de la corriente se debe a la disminución de canales funcionales en cada instante. En la disminución no participa el sistema de medición. En cambio en el bloqueo de la corriente que circula a través de un canal individual se produce porque el sistema de medición, al no poder seguir las transiciones rápidas entre el estado abierto y bloqueado, mezcla la corriente en un instante con la del instante anterior (Figura 2).

El valor de Kd medido de la disminución de la corriente macroscópica coincide con el valor de Kd determinado de la disminución de la corriente que circula a través de un canal individual, si se hacen las correcciones apropiadas que toman en cuenta que la apertura y cierre del canal dependen de potencial (Coronado y Miller, 1979).

Veremos más adelante que la disminución de la corriente causada por el bloqueador, es un fenómeno que se produce exclusivamente por las propiedades del sistema de medición. Del análisis de la distorsión de la señal

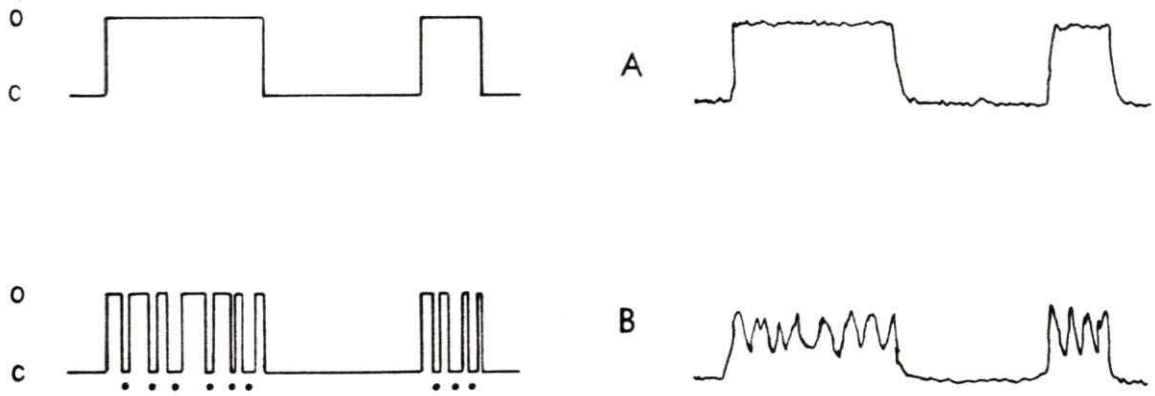

Figura 2
Interpretación del bloqueo a través de canal único.

En la columna izquierda se muestran los estados del canal. La columna de la derecha muestra como se vería la corriente en un experimento de corriente a través de canal único. A) Estados del canal, c) cerrado, o) abierto (•) bloqueado. Si el sistema de medición fuera infinitamente rápido así sería un registro de corriente. B) Las interrupciones de la corriente no resueltas producen una disminución de la conductancia y aumento del ruido .

causada por el sistema de medición se pueden estimar las constantes cinéticas del proceso de ligamen-liberación del bloqueador del sitio de ligamen.

En la sección siguiente se estudian algunas propiedades del sistema de medición causantes de la distorsión de la señal. Se usará como modelo los filtros, ya que la principal distorsión introducida en la señal es la sustracción de las altas frecuencias.

Filtros.

Los filtros son dispositivos electrónicos que cambian la composición espectral de las señales. Los filtros están descritos por una función de transferencia. Las singularidades de esta función corresponden a los llamados polos del filtro (para teoría y aplicaciones sobre filtros véase Malmstadt y col, 1974).

Un filtro de un polo se puede construir con una resistencia R, y un condensador de capacidad C, como se muestra en la figura 3. Para encontrar la ecuación que describe a este filtro, consideramos la corriente que circula a traves de él. Las corriente capacitiva y resistiva son i_c e i_R respectivamente. El potencial en la entrada del filtro es x y el potencial en la salida es y, ambos dependen del tiempo :

$$i_c = i_R \qquad 13a$$

$$C(dy/dt) = (x - y)/R \qquad 13b$$

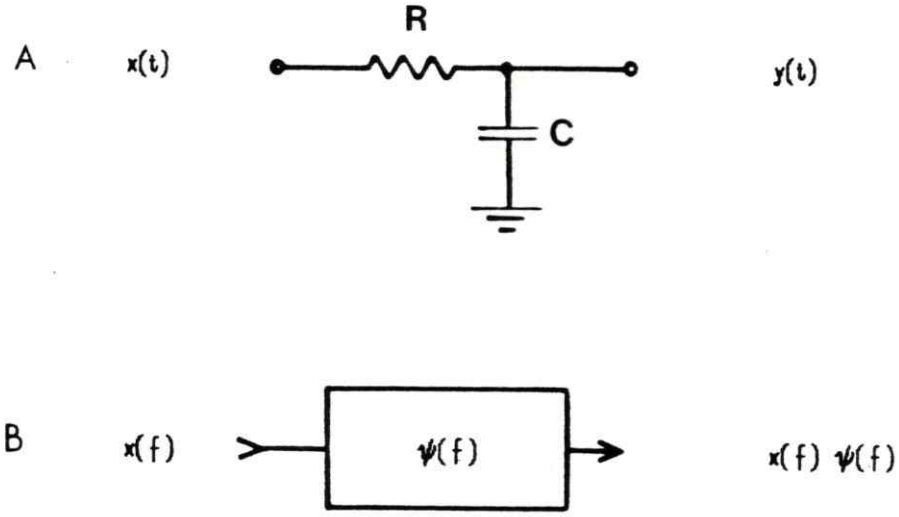

Figura 3
Filtro RC

A) El filtro RC consta de un condensador C, y una resistencia R. El filtro transforma un voltaje "x" en otro "y" ambos son dependientes del tiempo. B) La acción del filtro es multiplicar el espectro de frecuencias de la señal de entrada por la función de transferencia $\psi(f)$.

$$dy/dt = (x - y)/\tau \qquad \tau = RC \qquad 13c$$

Esta es la ecuación que describe los filtros de un polo. Para estudiar cómo cambia el filtro la composición espectral de la señal, pasamos la ecuacion 13c. al dominio de frecuencias, ya que en este dominio la transformación tiene una forma muy sencilla. Para esto tomamos la transformada de Fourier de la ecuación 13c. Se obtiene lo siguiente :

$$2\pi i f\hat{Y}(f) = (\hat{X}(f) - \hat{Y}(f))/RC \qquad 14$$

Aquí el símbolo ^ denota la transformada de Fourier de la función indicada, f es la frecuencia e $i=(-1)^{-1/2}$. Esta ecuación permite despejar la salida del filtro como función de la entrada. La expresion que se obtiene es la siguiente :

$$\hat{Y}(f) = \hat{X}(f)/(1+2\pi iRCf) \qquad 15$$

Entonces definimos la función de transferencia del filtro como :

$$\Phi(f) = 1/(1+2\pi ifRC) \qquad 16$$

Así la acción del filtro sobre la señal es multiplicar el espectro de frecuencias de ésta por la función de transferencia. Si la señal de entrada al filtro es x(t), se puede demostrar que la salida, en el dominio temporal esta dada por :

$$g(t) = (x*\hat{\Phi})(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t+s)\hat{\Phi}(s)ds \qquad 17$$

La función $\hat{\Phi}(t)$ es la transformada de Fourier de $\Phi(f)$.

Este resultado nos muestra que la salida del filtro, en el dominio temporal, está dada por la convolución de la señal de entrada con la transformada de Fourier de la función de transferencia. Este hecho se aprovechará en el diseño de una simulación numérica de un filtro (véase método experimental).

Distribución de amplitudes de una señal filtrada

Antes de entrar en detalles definiremos el histograma de amplitudes como un gráfico de la amplitud (normalizada, es decir la corriente maxima es uno) de la corriente en función de la fracción del total del tiempo de observación en que la corriente tiene esa amplitud.

Se ha visto que el filtro transforma las fluctuaciones de corriente del proceso de bloqueo de dos estados en una señal en la que parece haberse perdido la información temporal del proceso. Afortunadamente este no es el caso. Supongamos que el bloqueo es muy rápido, es decir las constantes cinéticas son muy grandes, en este caso la corriente fluctuará tan rápido que todas las transiciones serán promediadas. Si examinamos el histograma de amplitudes en este caso veremos que tiene todos los puntos concentrados en torno a una amplitud promedio. Si en cambio las constantes cinéticas son pequeñas, los tiempos de residencia del bloqueador en el

canal seran mayores, y eventualmente algunos de estos serán lo suficientemente largos como para no ser distorsionados. Si examinamos ahora el histograma de amplitudes veremos que una fracción considerable permanece cerca de la amplitud cero (canal bloqueado) y cerca de la amplitud uno (canal abierto).

Al considerar las propiedades del filtro (propiedades deterministas) y las propiedades del bloqueo (propiedades estadisticas) se puede encontrar una función que describe el histograma de amplitudes (FitzHugh, 1982, Apendice A). Esta función (en rigor una distribución) contiene como variables independientes las constantes cinéticas de ligámen y liberación (α, β') del bloqueador más la constante de relajación del filtro (τ). Si "y" es la amplitud y B(a,b) es la funcion Beta definida por :

$$B(m,n) = \int_0^1 s^{m-1}(1-s)^{n-1}ds \qquad 18a$$

La función que describe el histograma de amplitudes es :

$$f(y) = y^{a-1}(1-y)^{b-1}/B(a,b) \qquad 18b$$

$$a=\alpha\tau \qquad 18c$$

$$b=\beta'\tau \qquad 18d$$

En lo sucesivo se hará referencia a f como distribución Beta. Las propiedades de la función Beta se muestran en la figura 4.

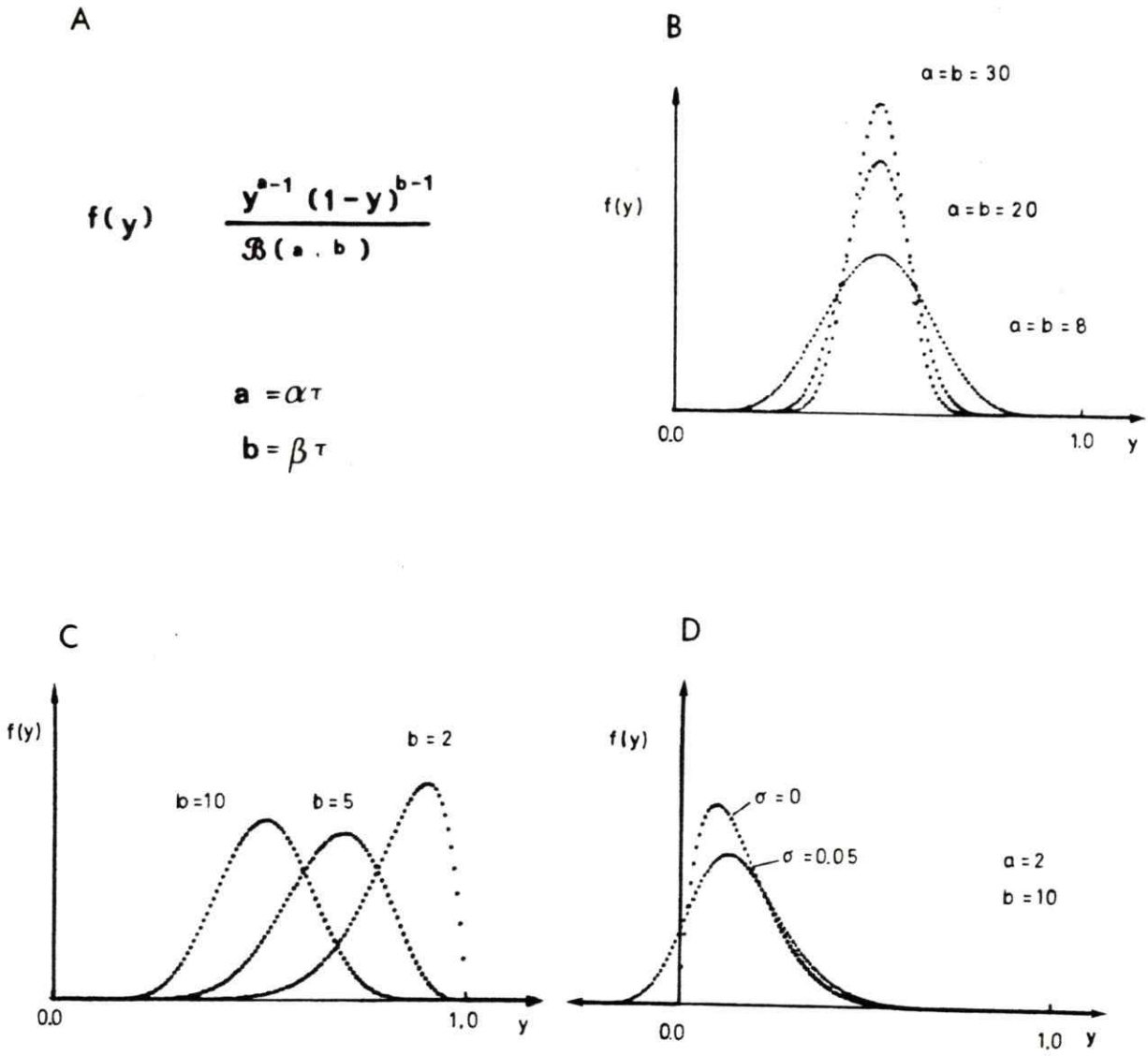

Figura 4
Propiedades de la función densidad de probabilidad Beta.

A) expresión analítica. B) Al hacer más grandes los prametros el histograma se adelgaza. Esto ocurre al filtrar la señal (aumenta τ) o al aumentar la rapidez del bloqueo (aumentar α y β). C) Al aumentar un solo parámetro el mximo del histograma se corre (por ejemplo al aumentar la concentracion de bloqueador el máximo se corre hacia cero). En la gráfica a=10. D) Ensanchamiento por convolución con una función gausiana de deviación estandar σ. El ruido inespecifico produce una ensanchamiento del histograma.

Valor esperado de corriente.

De la distribución beta se puede calcular el valor esperado de amplitud de corriente en presencia del bloqueador. Cuando el canal se bloquea, la corriente fluctúa en torno a un promedio con una cierta distribución. Es este promedio el que tendrá importancia en la medición de la corriente, y no la amplitud de mayor densidad, valor que intuitivamente podría creerse es el correcto.

Por definición el valor esperado de cualquier variable aleatoria es la suma sobre el espacio muestral de la variable aleatoria multiplicada por su densidad. Luego se tiene :

$$E(y) = \int_0^1 sf(s)ds = \int_0^1 s^a(1-s)^{b-1}ds/B(a,b) \qquad 19$$

Si se hace uso de la identidad entre la función Beta y la función Gamma (Boas, 1966) siguiente :

$$B(m,n) = \Gamma(m)\ \Gamma(m)/\Gamma(m+n) \qquad 20$$

En que Γ es la función Gamma definida como :

$$\Gamma(p) = \int_0^{+\infty} x^{p-1}e^{-x}\ dx \qquad 21$$

Esta función tiene la siguiente propiedad :

$$\Gamma(n+1) = n\Gamma(n) \qquad 22$$

Asi se puede calcular el valor esperado de la corriente, el resultado es :

$$E(y) = \int_0^1 ss^{a-1}(1-s)^{b-1}/B(a,b)$$
$$= (\Gamma(a+1)\Gamma(b)/\Gamma(a+b+1)/B(a,b)$$

$$=(a/(a+b))(\Gamma(a)\Gamma(b)/\Gamma(a+b))/B(a,b)$$

$$E(y) = a/(a+b) = \alpha/(\alpha+\beta') = (1 + \beta'/\alpha)^{-1} \qquad 23$$

El valor esperado es exactamente la probabilidad que el canal estando abierto no este bloqueado. Notemos que el valor esperado es independiente de la constante de tiempo del filtro, este hecho justifica el criterio que se usó para medir la corriente en presencia del bloqueador (vease método experimental).

Como nota didáctica, se puede agregar que, si se mide la amplitud de máxima densidad, no se está tomando un dato relevante a menos que la constante τ del filtro sea muy grande, en cuyo caso el valor máximo converge al valor esperado. No podría ser de otro modo ya que en esta condición extrema hay una sola amplitud que medir.

Ruido inespecífico.

Las fluctuaciones de corriente en torno a un promedio se deben, en último término, a la presencia del bloqueador, pero aún cuando éste no esté presente, siempre hay algo de fluctuaciones, este es el ruido inespecífico (puede deberse al sistema de medida, a movimiento térmico de partículas cargadas, o a otras causas no precisadas). Esta sección trata de cómo se incluye este ruido en el análisis.

Supongamos que la distribución del ruido inespecífico

es gausiana, es decir las fluctuaciones de corriente son al azar. La probabilidad que la corriente tenga un valor t si el promedio es s, está dado en términos de la siguiente función densidad de probabilidad :

$$g(t) = \exp(-(s-t)^2/4\sigma^2)/(2\pi)^{0.5}\sigma \qquad 24$$

El parámetro σ se llama desviación estandar de la distribución. Si se tienen dos distribuciones, f y g, la distribución de la suma esta dada por la convolución de las dos (Feller, 1971).

Luego si se mide la corriente con algún sistema que tiene la misma función de transferenia que un filtro de un polo, de constante de tiempo τ, y en las condiciones de medida hay un ruido inespecifico de distribución gausiana de desviación estandar σ, el ruido causado por el bloqueador se tranformará en uno que tendrá distribución :

$$H(s) = (f*g)(s) \qquad 25$$

El hecho que f sea una distribución que se anule fuera del intervalo (0,1) y que g tenga área 1 hace que H tambien tenga area 1, aunque no necesariamente se anule fuera del intervalo (0,1). Esta observación será importante en la construcción de los histogramas de amplitudes (véase método experimental).

METODOS

Método experimental

Esta sección está dividida en tres partes, en la primera se da una visión global del método experimental usado, junto con los problemas que se presentaron al realizarlo. En la segunda parte se explican en detalle las metodologías usadas, ya que gran parte de este trabajo tuvo que ver con la realización de éstas. La última parte trata de lo referente al análisis de los datos.

Visión global del método.

La primera parte de este trabajo consistió en la preparación de una fracción de vesículas ricas en membrana de túbulo transverso de rata (Rosemblat y col, 1981). Estas vesículas, que contienen la proteína que forma el canal, se usaron en los experimentos posteriores. La idea es tomar estas vesículas, fundirlas a membranas artificiales, y estudiar el canal inserto en la bicapa (Miller y Racker, 1976). Las membranas artificiales se forman espontaneamente al pintar con una solución de fosfolípidos un agujero hecho en una lámina delgada de teflón que separa dos medios salinos (Mueller y col., 1963).

La formación de la membrana se puede visualizar midiendo su capacidad eléctrica, que es proporcional al área de bicapa (0.6 μF/cm² de membrana, Alvarez y Latorre, 1978). Al aplicar un pulso cuadrado de potencial, se produce una corriente capacitiva en los puntos en que la variación del potencial es máxima. La integral de esta corriente es proporcional al cambio de voltaje y a la capacidad, y por ende al área de membrana.

Para medir la capacidad se construyó un generador de pulsos cuadrados y niveles constantes de potencial, estos últimos se usaron para establecer diferencias de potencial entre ambos lados de la membrana. Para medir la corriente, se construyó un conversor corriente-voltage de rápida respuesta de tiempo (τ=200 μs), tal que pueda captar con fidelidad las fluctuaciones de corriente a través canal. El conversor tiene además la propiedad de que la respuesta a un escalón de corriente es una exponencial, de modo que su función de transferencia es la de un filtro de un polo, analizado anteriormente.

La figura 5 resume la situación experimental. Parte del conversor corriente voltage (conversor I/V y amplificador) está en una caja de aluminio que contiene un compartimento donde va la cámara de teflón en la cual se

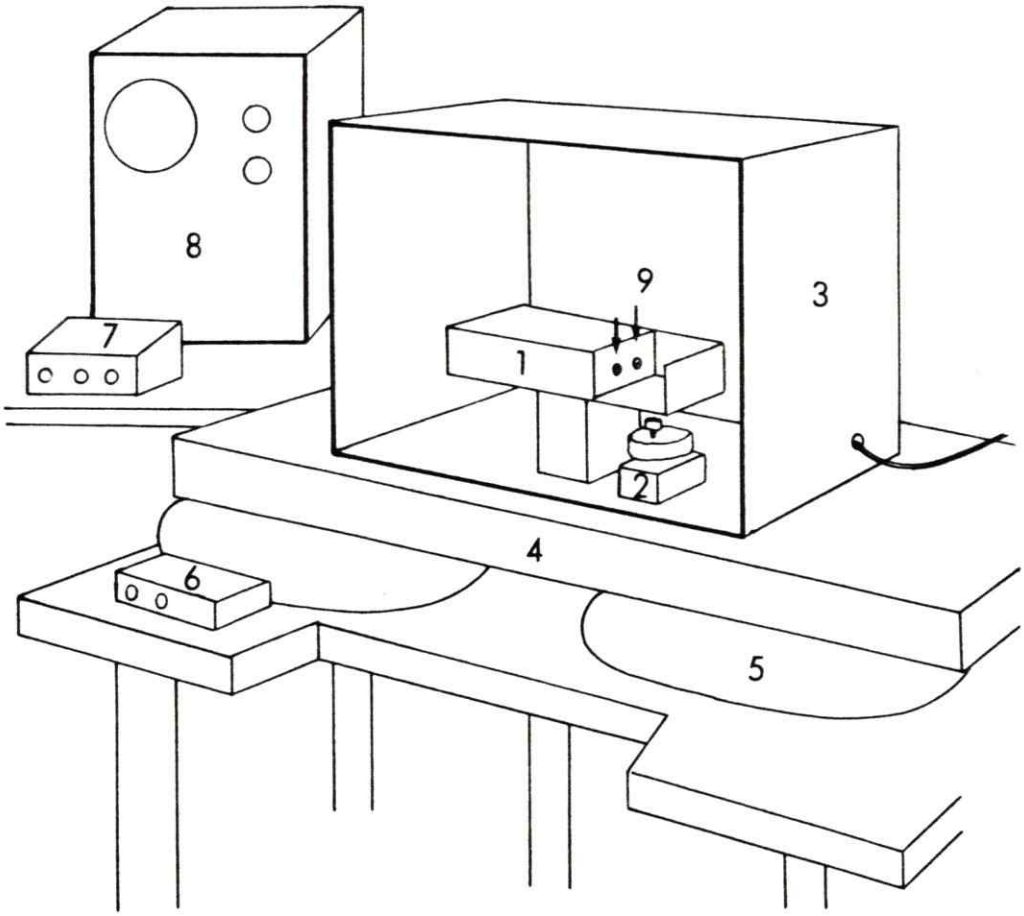

Figura 5
Montaje experimental.

1) Caja con el conversor corriente-voltaje y amplificador. 2) Motor eléctrico y agitador magnético (imán). 3) Caja metálica que actua como jaula de Faraday. 4) Mesa de mármol. 5) Neumáticos para absorber las perturbaciones mecánicas. 6) Generador de pulsos. 7) Compensador de frecuencias y filtro activo. 8) osciloscopio. 9) Conectores para electrodos.

fabrican las membranas artificiales. Dos electrodos puestos en la cámara permiten la aplicación de el potencial y registro de la corriente. Debajo de esta caja hay un motor eléctrico con un imán en su vástago, que permite agitar la solución con un pequeño agitador magnético puesto dentro en uno de los compartimientos de la cámara.

Es importante evitar las vibraciones mecánicas y perturbaciones eléctricas. Este problema se obvió incluyendo la caja de aluminio en otra caja metálica conectada a tierra que funciona como jaula de Faraday, y poniendo ésta en una mesa antivibratoria contruida con un bloque de mármol y tres neumáticos de automóvil. En una mesa aparte se puso el osciloscopio, el generador de pulsos, y la grabadora, usada para almacenar las fluctuaciones de corriente.

El problema principal que se tuvo en el análisis de los datos fué el de visualizar de un modo eficiente la señal grabada en la cinta magnética. Los números correspondientes a las amplitudes de las fluctuaciones, contenidas en la cinta magnética pueden ser transferidas al computador. Si se ven las fluctuaciones de corriente como una colección de números no es tan claro qué sector analizar, ó si ese trozo es un artificio (por ejemplo

ruido que se produjo al dar un golpe a la mesa). Por otra parte si se despliega la señal (análoga) en un registrador térmico, se puede tener una idea clara de las fluctuaciones, pero se pierde la referencia de cuales son los valores de las amplitudes a analizar. Para solucionar este problema fué necesario diseñar un dispositivo tal que permita visualizar pequeños sectores de la grabacion y graficarlas en la pantalla del osciloscopio (Alvarez y Villarroel, 1985). Con esto no sólo se ganó agilidad en el análisis de los datos, sino que también permitió visualizar los resultados del ajuste.

Detalle experimental.

Preparación de membranas de túbulo transverso.

Se prepararon vesículas de túbulo transverso de músculo esquelético de rata adulta usando una simplificación (Moczydlowski y Latorre, 1983) del método descrito en detalle por Rosemblatt y colaboradores (Rosemblatt y col. 1981).

En una juguera se homogenizó 400 g. de músculo, procedente de la espalda y las patas de seis ratas, en una solución que contiene KCl 100 mM y MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) llevado a pH 7 con KOH. Este homogenizado se cetrifugó a 10.000 g. durante 30 minutos en una centrifuga Sorvall RC2-B. El sobrenadante se

colectó y se agregó suficiente KCl en cristales como para obtener una concentración final de 500 mM, para solubilizar las proteínas contráctiles. Esta solución se centrifugó a 28.000 g. durante 60 minutos en una ultracentrífuga Beckmann modelo L, usando rotor 30.

El sedimento de 28.000 g se resuspendió en la misma solución buffer MOPS-KOH y se centrifugó nuevamente a 28.000 g. durante 60 minutos.

Este último sedimento se resuspendió en una solución de sacarosa 0.3 M preparada en MOPS-KOH 20 mM a pH 7. Esta suspensión de microsomas fue centrifugada en una gradiente discontinua de sacarosa a 80.000 g durante 16 horas en un rotor SW40. La gradiente consistió en dos capas de solución de sacarosa de concentración 25% y 35% (p/v) respectivamente. Se recogió la fracción que sedimentó entre las dos capas de sacarosa, y se resuspendió en un pequeño volumen del tampón sacarosa usado anteriormente. Posteriormente se dividió en pequeñas fracciones, se congeló por inmersión en hielo seco-acetona y se guardó a -80° C para ser usado posteriormente.

Parte de los experimentos se hicieron con una preparación proporcionada por el Dr. C. Miller a quien agradezco su gentileza.

Membranas artificiales.

Para fabricar las membranas artificiales se usa una cámara de teflón con un tabique que separa dos compartimentos. Sobre este tabique que tiene una muesca en forma de V se pega una delgada laminilla de teflón con un agujero en el centro (fig.6). El área de la membrana a formarse, y por tanto su capacidad, dependerá del tamaño del agujero, por lo cual es conveniente uniformar los tamaños de agujeros con que se trabaja.

Los agujeros se hicieron de dos modos distintos. El primero consistió en usar una aguja de jeringa de diámetro conocido, con la punta afilada, y usarla a modo de sacabocados. Con este método se consiguen agujeros de 200-400 µm. Este método permite obtener agujeros de tamaño uniforme.

El segundo método consiste en hacer el agujero con un filamento de platino calentado al rojo (usando un cautín). Si se usa alambre de 25 µm de diámetro, se obtienen agujeros de 30-100 µm.

Electrodos.

Para aplicar el potencial y medir la corriente se usaron electrodos reversibles de Ag/AgCl, conectado a un puente salino de agar-Kcl 3 M.

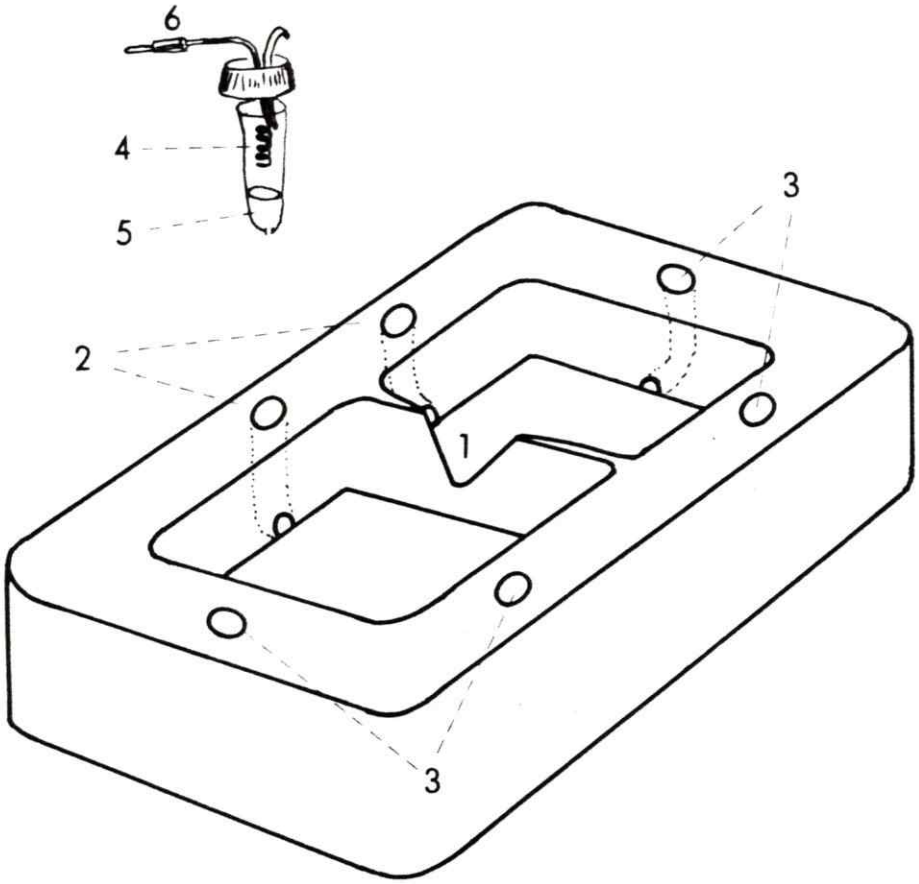

Figura 6
Camara de teflón y electrodo.

1) Muesca en forma de V en la que se fija la lámina de teflón con un agujero en que se "pinta" la membrana. 2) Agujeros para insertar electrodos. 3) Agujeros que permiten cambiar soluciones. 4) Electrodo de Ag/AgCl. 5) Puente salino de agar-KCl. 6) Conector del electrodo. La capacidad de cada compartimento es de 3 ml.

Generador de pulsos.

Se construyó un generador de pulsos con dos modalidades de funcionamiento. Un oscilador genera pulsos rectangulares de amplitud ajustable, estos se usaron para estimar la capacidad de la membrana. Una pila de 1.5 V conectada a los extremos de un potenciometro de 10 vueltas permite dar niveles constantes de potencial, estos se usaron para establecer un potencial constante entre ambos lados de la membrana (fig.7).

Lipidos.

Los lipidos se mantuvieron en cloroformo a -20° C. En el momento de ser usados se llevaron a temperatura ambiente, se tomaron las cantidades necesarias, y se evaporó el cloroformo usando nitrógeno. La solución de lipidos que se usó en la mayoria de los experimentos fué una mezcla de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), a una concentración de 10 mg/ml y 4 mg/ml respectivamente. El solvente usado fué n-decano.

Cuando fue necesario hacer membranas en condiciones salinas asimétricas, se usó PE (14 mg/ml) en el mismo solvente. Debido a que el PS es un lipido cargado, variaciones grandes en la fuerza iónica producen cambios en el potencial de superficie de las membranas.

Las membranas se forman espontáneamente pintando el

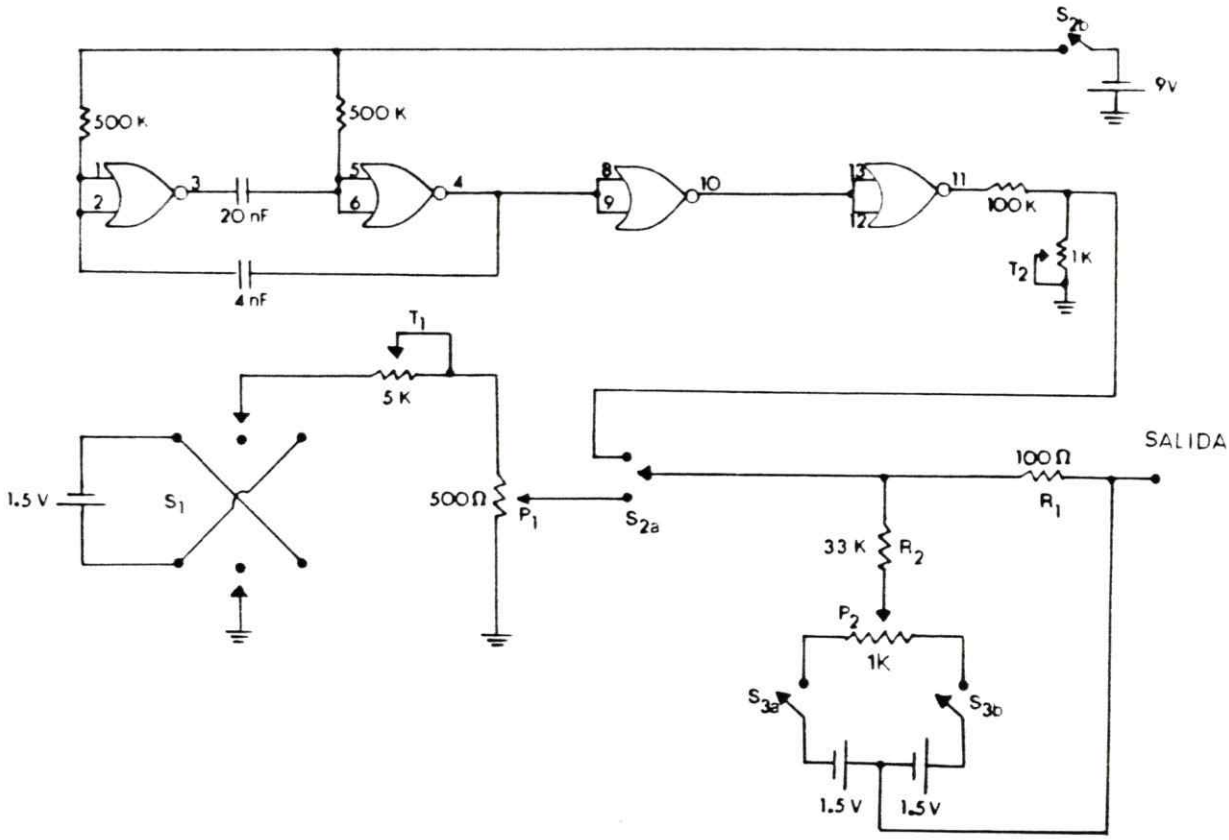

Figura 7
Generador de pulsos.

Los pulsos se generan en dos circuitos logicos NOR (CMOS), que constituyen un oscilador. El potenciometro T_2 permite regular la amplitud de los pulsos. Una pila de 1.5 volt genera niveles de potencial, cuya amplitud máxima se ajusta con T_1. El interruptor S1 permite cambiar el signo del potencial. Dos pilas de 1.5 volts permite adicionar un potencial cuya magnitud se regula con P_2, al conectar el interruptor S_3. El interruptor S_2 permite escojer entre pulsos o niveles de voltaje.

agujero con la mezcla de lípidos con un pincel de pelo de camello o un bastón de vidrio fabricado con una pipeta desechable de 20 µl. La formación de la bicapa se siguió midiendo su capacidad.

Para agujeros de 400 µm se obtuvieron capacidades de 300-500 pF, usando cualesquiera de las dos mezclas de lipidos. Si se usan agujeros pequeños las capacidades obtenidas van entre 50-100 pF.

Incorporación de canales.

Como medio salino se usa una solución de KCl 100 mM y MOPS-K 5 mM, a pH 7, que se agrega a ambos lados de la cámara para construir la membrana. La concentración de calcio fue de 10-50 µM, nunca más de 100 µM, que se agregó como una alicuota de una solución 30 mM. Una vez que la capacidad se estabiliza, se agregan 5-20 µl vesículas de túbulo transverso en el lado donde está el electrodo de potencial. Debido a la orientación de las vesículas siempre el lado citoplasmático del canal (lado suceptible de unir selectivamente Ca^{+2}) queda orientado hacia donde se agregaron éstas. En lo sucesivo cis alude al lado citoplasmático del canal, al lado sensible a Ca^{+2} y al lado del electrodo de potencial.

Manteniendo la solución en agitación constante el canal se incorpora entre los 2-240 minutos siguientes. El

canal se visualizó observando las fluctuaciones de corriente al aplicar un nivel de potencial, que generalmente fué +40 mV.

Medición De Corrientes

Para la medición de corrientes se requiere un conversor corriente voltage que tenga una respuesta dinámica lo suficientemente rápida como para captar las fluctuaciones de la corriente a través del canal, que son del orden de milisegundos. Ademas la respuesta de tiempo debe ser exponencial, para permitir el análisis del ruido del canal abierto. Por último debe tener bajos niveles de ruido eléctrico.

Si se usa un conversor corriente voltage con un amplificador operacional, como muestra la figura 8a, el potencial en la salida es $-IR_f$, en que R_f es la resistencia de retroalimentación, I es la corriente a la entrada del conversor. Por lo tanto si se está midiendo una corriente pequeña, se requiere que R_f sea grande para obtener en la salida un potencial apreciable que pueda ser almacenado sin distorción. Por ejemplo, si la corriente es de 10 pA al poner una resistenca de 10^{10} Ω, el potencial que se obtiene en la salida es de 0.1 volts.

Un problema que va asociado a este valor alto de resistencia de retroalimentación es su capacidad

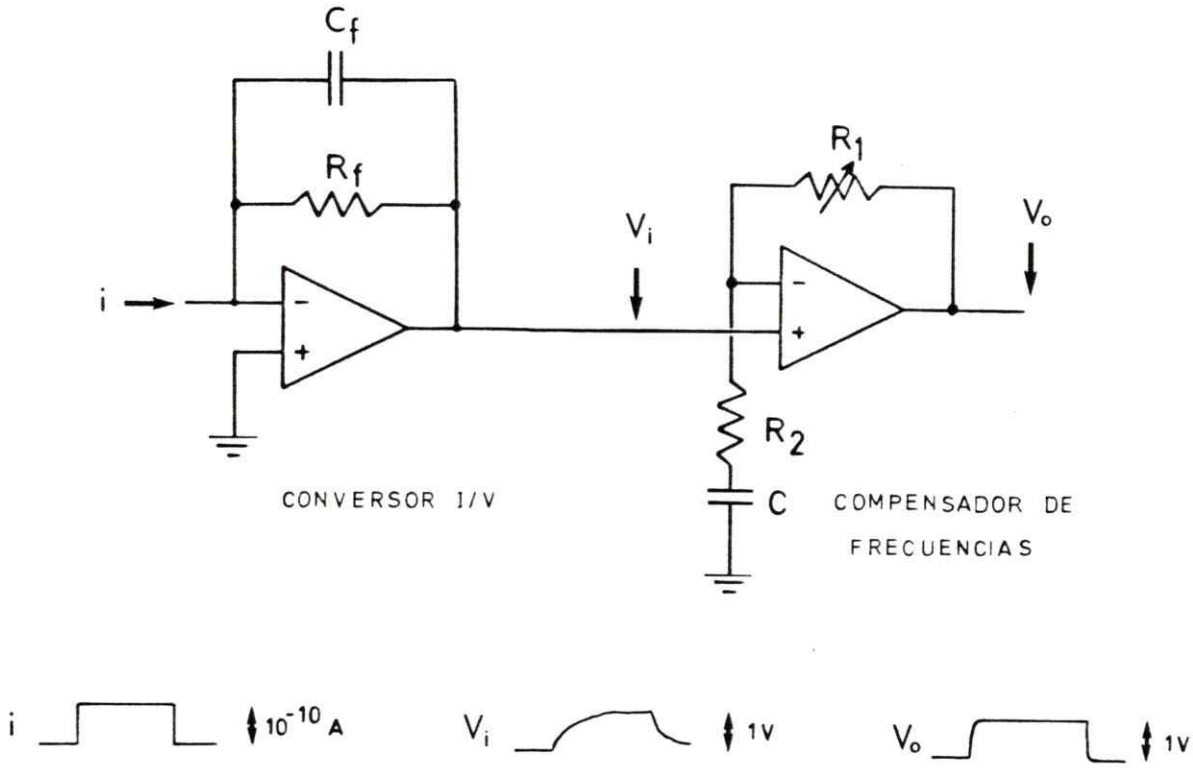

Figura 8
Esquema del circuito de un conversor corriente-voltaje y compensador de frecuencias.

Debido al alto valor de Rf ($10^{10}\Omega$) la constante de tiempo R_fC (C es la capacidad asociada a R_f) es muy grande, limitando la respuesta de tiempo. del conversor I/V. La segunda etapa es un compensador de frecuencias (Sigworth, 1983). A bajas frecuencias C no conduce, y el compensador de frecuencias se comporta como un seguidor de voltaje. A altas frecuencias el condensador conduce, y el compensador de frecuencias actúa como un amplificador de ganancia muy grande. i, V_i, V_o señales en cada etapa del circuito.

intrinseca, que es del orden de 0.1 pF (Sigworth, 1983). En este caso el conversor se convierte en un filtro activo de constante de tiempo $\tau=R_f C_f$ del orden de un milisegundo. Con un sistema con estas caracteristicas no se podrian detectar las fluctuaciones de corriente que nos interesan.

Un modo de aumentar la rapidez del conversor es disminuir la capacidad C_f, esto se logra poniendo un conductor a tierra en las cercanias de la resistencia de retroalimentación. Sin enbargo, la respuesta de tiempo sólo puede ser aumentada hasta un cierto límite por este método. Cuando la corriente en la entrada del conversor varía bruscamente, el amplificador toma cierto tiempo en llevar a cero el potencial de la entrada inversora, por sobre este límite la señal se distorsiona (Alvarez y col. 1985).

Otro modo de aumentar la respuesta de tiempo es agregar las altas frecuencias, sustraidas a la señal por el conversor corriente voltage (Sigworth, 1983). Este circuito compensador de frecuencias es el que se muestra en la figura 8b. Para este circuito si el potencial en la entrada es V_i, el potencial en la salida es :

$$V_o = V_i + R_1 C(dV_o/dt) \qquad 26$$

V_o es el potencial en el condensador C. Si hacemos que la entrada a este circuito sea la salida del conversor I/V, es decir

$$V_1 = I_o R_f \ (1 - e^{-t/\tau}) \qquad 27$$

En que $\tau = R_f C_f$ es la constante de tiempo del conversor corriente voltaje, la salida del compensador de frecuencias será :

$$V_o = -I_o R_f (1 - e^{-t/\tau} - [R_2 C/(\tau - R_1 C](e^{-t/\tau} - e^{-t/R_1 C})) \qquad 28$$

Si ponemos la condición que $\tau - R_1 C = RC_2$ la salida del compensador de frecuencias será :

$$V_o = I_o R_f (1 - e^{-t/R_1 C}) \qquad 29$$

Con esta modificación se logra aumentar considerablemente la respuesta de tiempo del conversor corriente voltaje.

Una consecuencia de agregar las altas frecuencias a la señal es el aumento de ruido. Al amplificar esta señal se amplifica tambien el ruido. Por estos motivos, se prefirió amplificar la señal antes de corregir la respuesta de tiempo. Se intercaló un amplificador de ganancias 1,5, y 10. A continuación se conectó un filtro RC, este cumple dos propósitos, eliminar las altas frecuencias producidas por el amplificador, y dejar la señal proveniente del conversor, perfectamente exponencial para que pueda ser corregida por el compensador de frecuencias (fig.9).

Un filtro activo de dos polos puesto a continuación del compensador de frecuencias permite filtrar la señal a voluntad eliminando fundamentalmente el exceso de altas

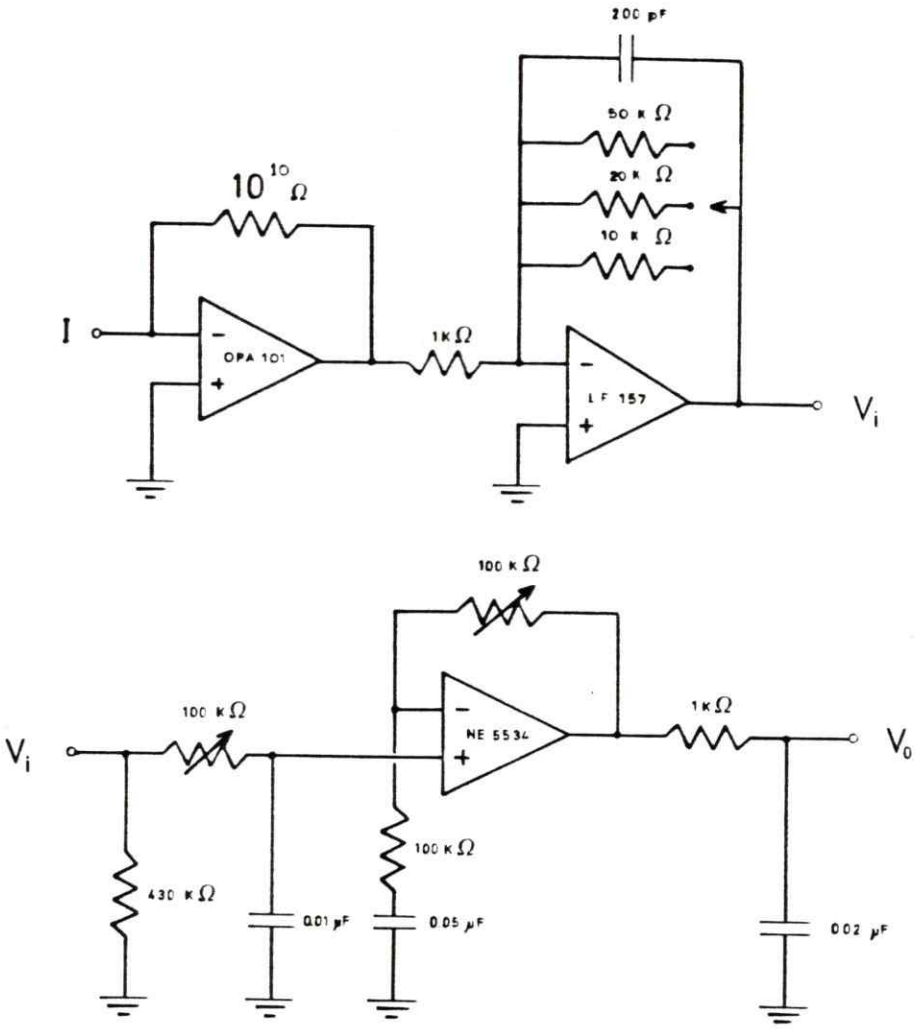

Figura 9
Sistema de medición de corrientes.

El conversor consta de un amplificador operacional en configuración de conversor corriente voltaje (OPA 101). El siguiente amplificador invierte la señal y la amplifica por 10, 20, y 50. Un filtro RC (100 KΩ, 0.01μF), un compensador de frecuencias (NE 5534) y un segundo filtro RC (1 KΩ, 0.02 μF). A continuación del circuito mostrado se conectó un filtro activo variable (1 - 5KHz). La respuesta de tiempo del sistema total incluyendo el filtro activo tiene una rapidez máxima de 200 μs.

frecuencias (frequencias mayores que 1 o 5 kHz.).

Con el circuito en estas condiciones, se puede registrar una señal con respuesta de tiempo de 200 µs, y con un nivel de ruido de menos de 1 pA.

Grabación.

La señal se digitalizó usando un conversor análogo-digital de 8 bits, con una resolución de 40 mV/bit, con una rapidez de conversión de 10000 muestras/s. Esto corresponde a una resolución temporal de 5 kHz. La señal digitalizada se grabó, para su posterior análisis, en una grabadora digital de 8 bits (Kennedy modelo 9700). El tamaño de la señal, en la mayoría de los casos fué de 1-5 volts.

La grabadora dispone de un conector que permite transferir los datos a la memoria del computador uando una puerta paralela. Algunas de estas lineas se usan para comandar el mecanismo de trasporte de la cinta desde el computador.

Análisis de las corrientes

Visualización de los datos adquiridos.

La visualización de los datos trasladados de la cinta magnética a la memoria del computador se hizo con una tarjeta de interfase que genera una señal de barrido para el osciloscopio. De este modo la señal de la cinta magnética puede ser recreada en un gráfico de amplitud en función del tiempo. El eje vertical se genera de la conversión digital-análoga de los contenidos de la memoria. El eje horizontal se genera de las direcciones de memoria. (Alvarez y Villarroel, 1985).

Curvas corriente-Voltaje.

Para estimar los parámetros de bloqueo Kd(O) y zó, se fabricaron curvas corriente-voltaje en el intervalo de ± 80 mV. Para medir la corriente que pasa a través del canal se usaron dos métodos. El primero consistió en desplegar en papel las fluctuaciones de corriente, usando un registrador térmico, y medir la altura del salto de corriente. Este método permitió obtener curvas I/V de un modo bastante rápido.

Hubo casos en que este método no fue apropiado; Cuando la probabilidad de apertura es baja el registrador no alcanza a captar la apertura completa, ya que el tiempo

de permanencia en el estado abierto es muy corto, y el valor de la corriente medido es menor que el real. Cosa análoga sucede en condiciones en que la probabilidad de apertura es muy alta.

Otra dificultad surge al medir la corriente a través de un canal en presencia de compuestos que inducen un bloqueo lento. En esta situación un gran aumento de ruido en el canal abierto acompaña a la disminución de conductancia, y no es evidente que amplitud de corriente considerar.

En los casos anteriores se prefirió medir la diferencia entre la corriente promedio del canal abierto menos la del cerrado. Del registro de fluctuaciones, tomado a 0.1 ms/punto , se tomaron trozos de 50 ms de duración, tanto del estado abierto como del cerrado, y se calculó la diferencia entre los promedios de puntos.

Filtro digital.

Algunas veces fué necesario filtrar la señal después que los datos habian sido adquiridos. Al visualizar los datos en la pantalla del osciloscopio en pequeños sectores de tiempo (25 ms) se vió que en algunos casos había un exceso de ruido. Para estos casos se diseñó un algoritmo de cálculo que simula un filtro de un polo. El diseño está

basado en un procedimiento descrito. (Colquhoun y Sigworth, 1983).

El procedimiento es el siguiente : La salida del filtro está dada por la convolución entre la función de entrada y la transformada de Fourier de la función de transferencia, según se mostró en la sección Teoría. La transformada de Fourier de la función de transferencia del filtro es :

$$\Phi(s) = e^{-|s|/\tau} \qquad 30$$

Así la salida del filtro es :

$$y(t) = \sum e^{-|t-s|/\tau}\, x_i(s) \qquad 31$$

Donde la suma se extiende para todos los valores experimentales $x_i(s)$. Los términos de esta serie están relacionados por la siguiente fórmula de recurrencia :

$$y_n = (1/S)[x_n + y_{n-1} e^{-t/\tau}] \qquad 32a$$

$$S = \sum e^{-t/\tau} \qquad 32b$$

De este modo el procedimientoa seguir será tomar un valor experimental x_i, operar sobre los valores anteriores y reemplazar el resultado obtenido por el valor x_i. Para el primer punto del registro la serie tendrá un solo término, esto significa que el comienzo de cada muestra quedará mal filtrado. Según esta observación cuando fué necesario filtrar no se escogió una región de interés, sino que se operó sobre toda la muestra (El largo de cada muestra fué de 3,2 s).

La figura 10 muestra las curvas obtenidas al aplicar

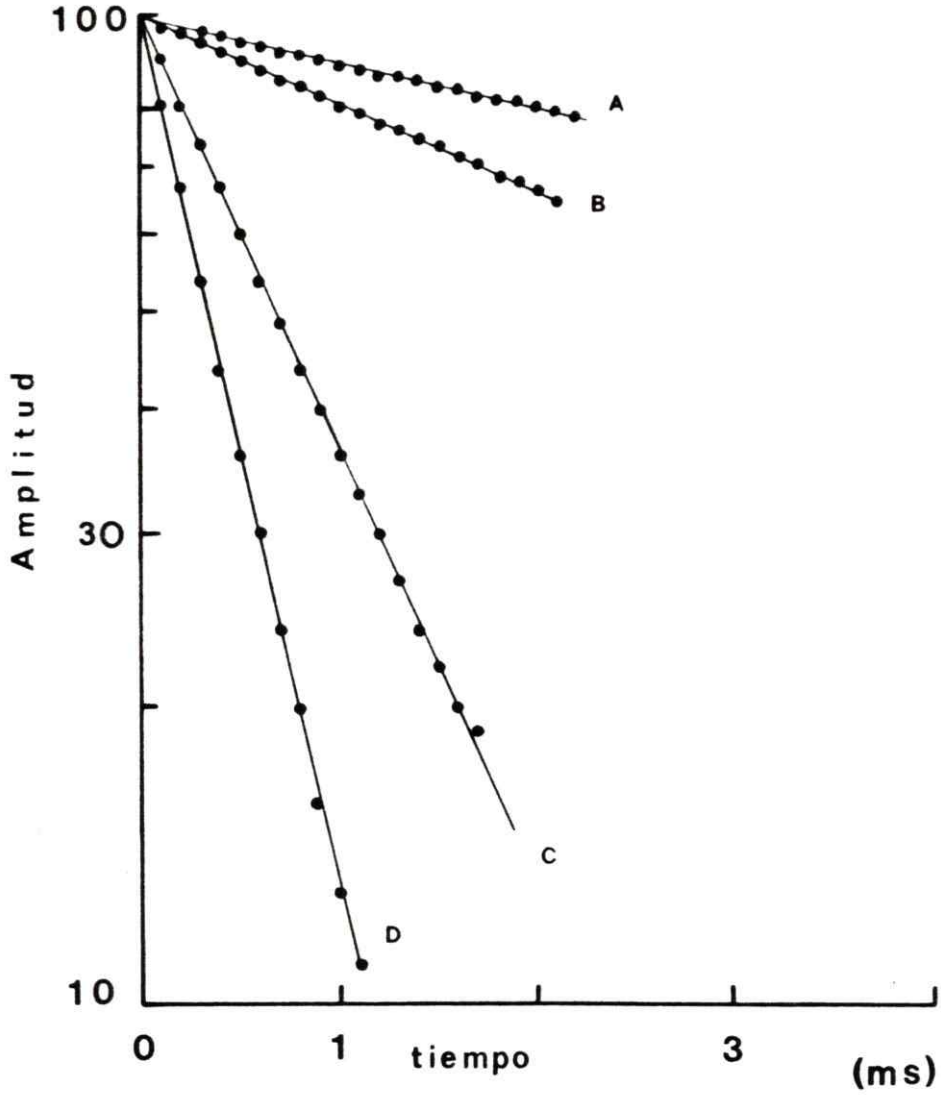

Figura 10
Filtro digital simulado por un computador.

Las curvas muestran la respuesta obtenida al filtrar pulsos cuadrados de amplitud 100 puntos y de 100 ms de duración (1000 puntos). Para un filtro de un polo estas curvas deben ser exponenciales con constante de tiempo τ, la constante que caracteriza a los filtros de un polo. A) τ teórico 10 ms, experimental 9.86 ms. B) τ teórico 5 ms, valor experimental 4.86 ms. C) τ teórico 1 ms, valor experimental 0.99 ms. D) τ teórico 0.5 ms, valor experimental 0.48 ms. Amplitud en escala logarítmica.

el filtro digital a un pulso cuadrado. La respuesta exponencial indica que el algoritmo simula bien el comportamiento de un filtro de un polo, para un amplio rango de τ.

Estimación de parámetros

De los valores de corriente obtenidos se calculó la corriente relativa dividiendo la corriente que pasa por el canal en presencia del bloqueador (I) por la corriente en ausencia de éste, en las mismas condiciones (I_o). La corriente relativa se ajustó a la ecuación :

$$I/I_o = (1 + [B]/Kd)^{-1} \qquad 33a$$

$$Kd = Kd(0)e^{-zFV/RT} \qquad 33b$$

Para encontrar los parámetros que describen mejor los puntos experimentales se utilizó el método de ajuste no lineal de Gauss-Newton, modificado por Hartley (Chrisman y Tumolillo, 1969). El programa de computación para realizar el ajuste no lineal fue proporcionado gentilmente por A. Oberhauser, R. Delgado y C. Alcayaga, quienes lo desarrollaron en lenguaje Fortran IV. El método consiste en calcular la curva con los parámetros iniciales dados, y computar la suma de cuadrados de las diferencias entre la curva experimental y teórica, luego variar los parámetros y buscar los que minimicen la suma de cuadrados. El método da como resultado el parámetro y su deviación estandar,

junto con la suma de cuadrados final.

Mediciones cinéticas.

Para el proceso de ligamen-liberación del bloqueador se determinaron las constantes cinéticas del aumento de ruido del canal abierto, producido por el bloqueador, usando el análisis de la distribución de amplitudes de la señal filtrada.

Si el canal se bloquea con probabilidad β', el bloqueador se libera con probabilidad α, y se registra la corriente con un conversor I/V de respuesta de tiempo τ, el histograma del ruido del canal abierto esta descrito por la expresión siguiente (FitzHug, 1982) :

$$f(y) = y^{a-1}(1-y)^{b-1}/B(a,b) \qquad 34a$$

$$a = \alpha\tau \qquad 34b$$

$$b = \beta\tau' \qquad 34c$$

La amplitud y toma valores entre cero (canal cerrado) y uno (canal abierto). Observaciones cualitativas muestran que esta expresión tiene sentido. Si la probabilidad que el canal se bloquee es baja, la disminución de la corriente es pequeña y el histograma resultante tiene el máximo en la región del estado abierto (amplitud 1). Si las constantes de ligamen y liberación del bloqueador son parecidas, el tiempo promedio bloqueado sera cercano al tiempo promedio abierto, en esta situación se obtendrá un

un máximo en la amplitud 1/2.

Las observaciones anteriores nos muestran que la magnitud relativa de las constantes cinéticas queda expresada en la posición del máximo en el histograma de amplitudes. Cuanto más rápido sea el proceso de ligamen - liberación del bloqueador, menores serán los tiempos de permanencia en cada uno de los estados , en este caso habrá muy poco ruido y el histograma tendrá todos los puntos concentrados en torno a una amplitud, y por tanto lucirá angosto.

Fué necesario considerar las propiedades de la función densidad de probabilidad f en la construcción de los histogramas. De acuerdo a la expresión analítica que describe el histograma de amplitudes, la amplitud del canal abierto debe ser uno y la del canal cerrado debe ser cero, independiente de la condiciones en que se tomó el registro. Por otra parte el área del histograma debe ser 1, ya que representa la probabilidad que la señal tenga alguna amplitud cualquiera. Estas consideraciones se tomaron en cuenta en la construcción de los histogramas.

Construcción de histogramas de amplitudes.

A partir de un registros de fluctuaciones, trasladado de la cinta magnética a la memoria del computador, en que cada punto representa una muestra tomada cada 0.1 ms, se construyeron histogramas del número de veces que se obtiene una cierta amplitud. Cada amplitud se dividió por la corriente promedio del canal abierto en ausencia del bloqueador. De este modo el canal abierto tiene amplitud uno y el canal cerrado tiene amplitud cero. Se tomaron sectores de 2.000 a 30.000 puntos, y se sumaron todos los puntos correspondientes a una amplitud determinada, este valor dividido por el área total de histograma constituyó el valor f(y) correspondiente a la amplitud y.

Para fijar los límites del histograma, se calculó la amplitud promedio de un sector del registro en que el canal permaneció cerrado, este valor constituyó la amplitud cero. La amplitud uno se calculó como la diferencia entre la amplitud cero y la amplitud del canal abierto en ausencia del bloqueador.

Un problema que fué necesario considerar es la contribución de ruido inespecífico al ruido producido por el bloqueador. Este ruido se debe principalmente a la capacidad de la membrana, y al conversor I/V. Para incluir la contribución de ruido inespecífico la función que se

usó para hacer el ajuste fue la distribución beta convolucionada con una distribución gausiana de desviación estandar σ. La razón de esto es la siguiente; supongamos que estamos midiendo una amplitud s, que tiene una probabilidad f(s)ds de ocurrir; debido al ruido inespecifico habrá una probabilidad de errar la medida. Para considerar este error multiplicamos f(s)ds por una distribución gausiana centrada en la amplitud correcta s. Con esto consideramos los puntos que se escapan a nuestra medición, pero también hay puntos que se escapan a otras mediciones, y que contribuyen a la nuestra. Para contabilizar estos, sumamos todas las amplitudes ponderadas por la probabilidad de ocurrencia de cada una, la función que se obtiene es justamente la convolución de la distribución beta con la distribución gausiana.

La función teórica que se usó para ajustar los histogramas fué la distribución convolucionada. Debido a que el ajuste depende fuertemente del valor de la desviación estandar σ, fué necesario medir muy cuidadosamente este valor. Se midió el ruido inespecifico construyendo un histograma del ruido del canal abierto para cada condición, y se ajustó a una distribucion gausiana de promedio p y desviación estandar σ. El valor de σ medido de este modo fué el que se usó para hacer el ajuste, y determinar las constantes cinéticas .

RESULTADOS

BLOQUEO DE CORRIENTES

Antecedentes.

Según el modelo de bloqueo presentado en la sección teoría, el bloqueador causa interrupciones en la corriente que circula a través del canal. Si el tiempo de permanencia en el estado bloqueado es pequeño, se produce una disminución aparente de la conductancia, en caso contrario, es posible visualizar las interrupciones de la corriente. En los resultados que se describen a continuación se muestra que estos dos tipos de bloqueo son posibles en el canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético.

Modos de bloqueo.

La acción de los compuestos amonio cuaternarios sobre las corrientes es de dos tipos, como se ilustra en la figura 11. El Tetrametilamonio (TMA) y el noniltrimetilamonio (C9) afectan a la corriente de un modo distinto. Al agregar TMA a una concentración de 28.7 mM en el lado <u>cis</u> del canal se produce una disminución aparente de la corriente, como lo predice el modelo de bloqueo de corrientes a través de canal único en el caso en que los tiempos de permanencia en los estados abierto y bloqueado

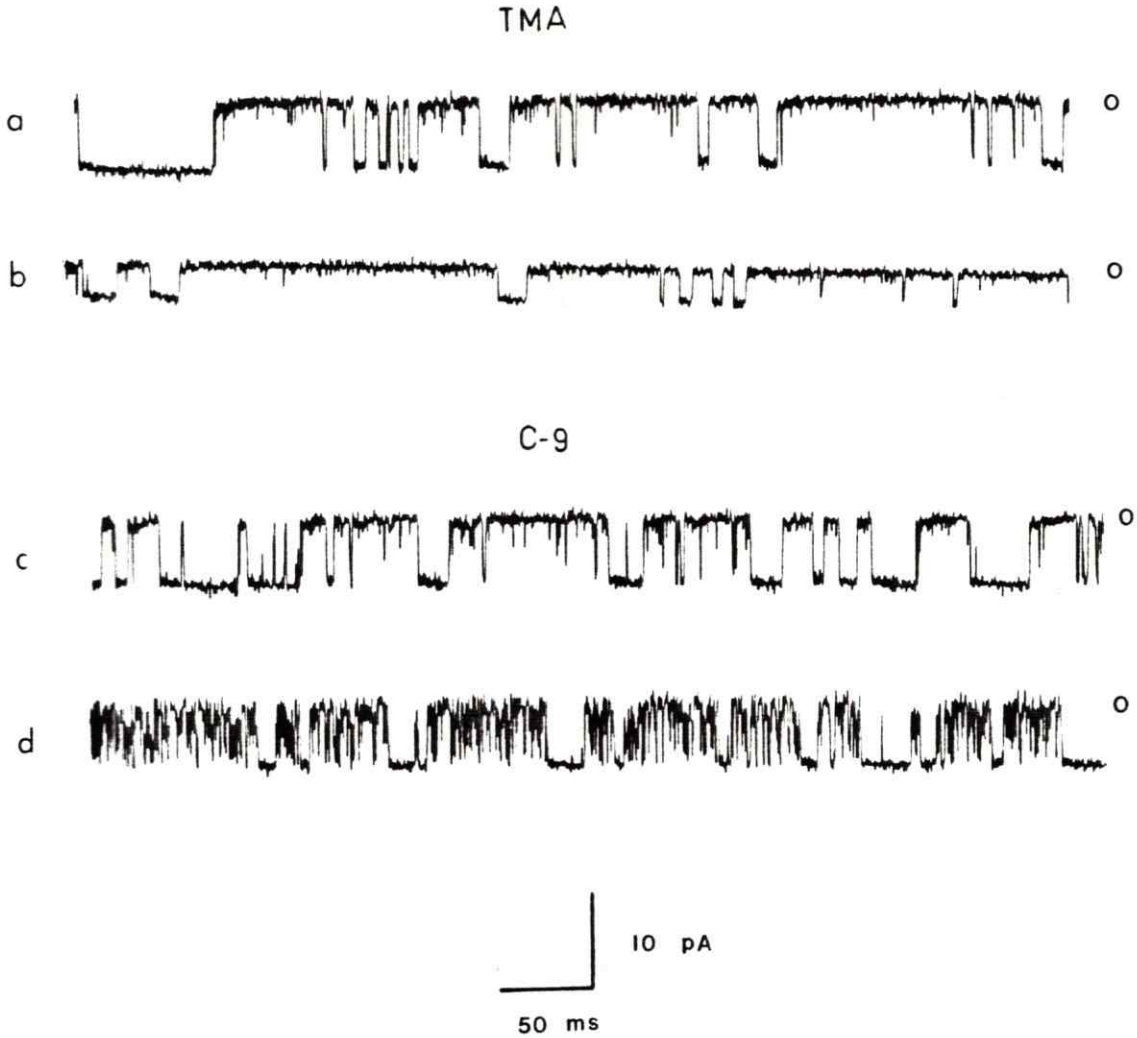

Figura 11
Acción de compuestos bloqueadores sobre la corriente a través del canal.

Estos compuestos muestran los dos modos extremos de bloqueo. TMA produce una disminución de la corriente, sin afectar el ruido del estado abierto (o), acción caracteristica de un bloqueo rápido. En cambio C9 produce breves interrupciones de la corriente que aparecen como un aumento de ruido. a) Control en 100 mM K^+ a ambos lados de la membrana, b) Similar a (a), pero en prescencia de 28.7 mM de TMA puesto en el lado citoplasmático. c) Igual que a). d) Similar a a) pero con 1.6 µM de C9 puesto en el lado cis. Ambos canales fueron incorporados en membranas de PE/PS 4:1. El potencial se mantuvo en +60 mV.

son muy cortos. Puede observarse que no hay un aumento significativo del ruido asociado a la corriente a través del canal abierto. El segundo compuesto, C9, afecta a la corriente de un modo distinto. Su acción es producir breves interrupciones en el estado abierto del canal. El estado cerrado no es afectado apreciablemente. En este caso los tiempos de permanencia en los estados abierto y bloqueado son lo suficientemente largos como para ser medidos.

La figura 12 muestra como se afecta la curva corriente voltaje al poner TEA en el lado cis del canal. Esta curva muestra que el bloqueo es dependiente del potencial eléctrico aplicado a través de la membrana, ya que el bloqueador es más efectivo cuando se aplica un potencial positivo en el lado cis de la membrana .

La figura 13 muestra una linearización de la ecuación 33 en función del potencial. I es la corriente en ausencia del bloqueador e I_o es la corriente control. En los experimentos que se describen a continuación se usó este tipo de gráficos para calcular los parámetros de bloqueo Kd(O) y zó, con la única diferencia que se le entregó al programa de ajuste la corriente relativa. A la cual se le ajustó la ecuación 33 sin hacer ninguna transformación.

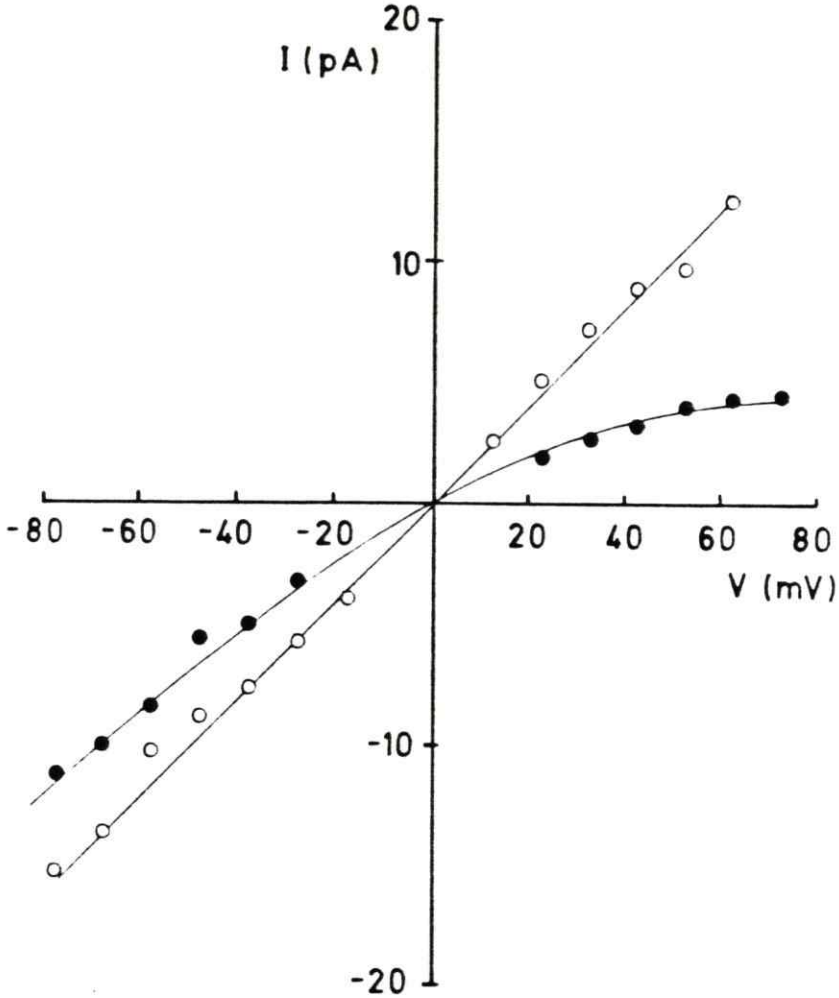

Figura 12
Bloqueo por tetraetilamonio (TEA).

El bloqueo por TEA es dependiente de potencial, la mayor disminución de la conductancia se obtiene a potenciales positivos. Las curvas se dibujaron de acuerdo a la ecuación 33 con un Kd(0)=34 mM y un zδ=0.34. El canal fué incorporado en membrana de PE. El TEA se puso en el lado <u>cis</u> a una concentració de 33 mM (●). Control, sin TEA (o).

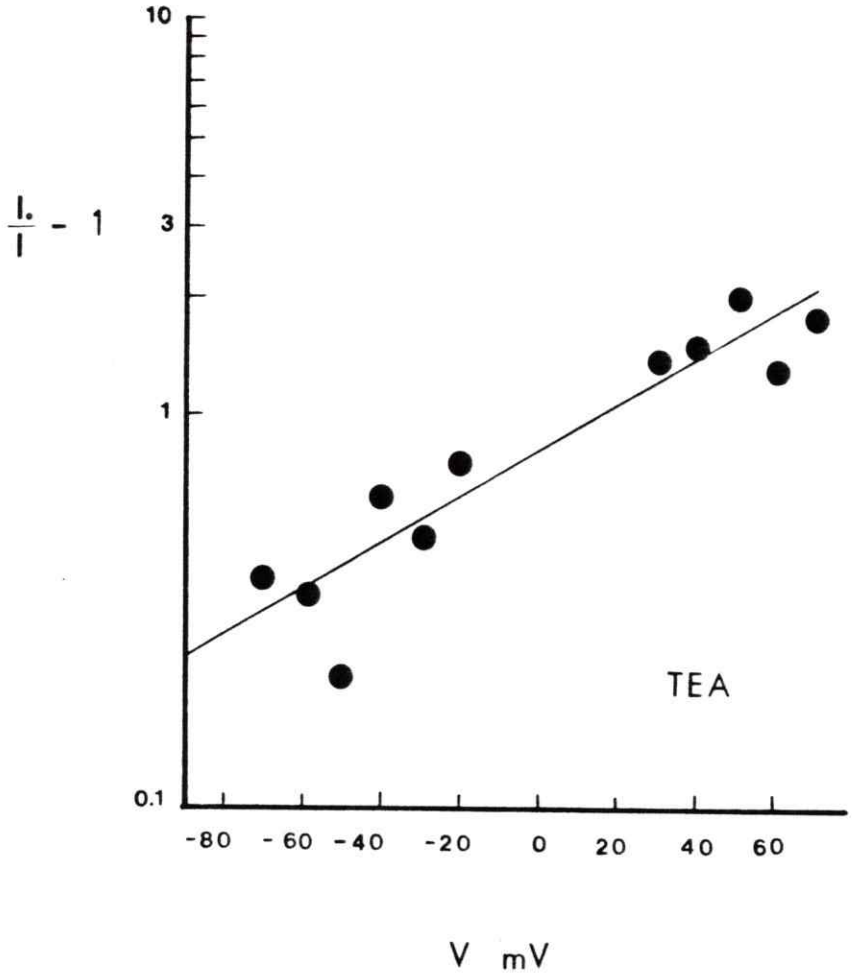

Figura 13
Experimento tipico.

La curva de la figurá 12 se puede linealizar usando una transformación de la ecuación 33. En la transformación mostrada de la pendiente de la curva se extrae zó ;Kd(O) se obtiene del valor de la ordenada para V=O. Escala, logaritmica de $(I_o/I)-1$.

Conclusiones.

Estos resultados indican que los amonios cuaternarios son capaces de alterar la corriente que circula a través del canal, y lo hacen de dos modos distintos. Uno de ellos se manifiesta como una disminución de la conductancia, y el otro como breves interrupciones en la corriente. El hecho que el bloqueo causado por TEA sea dependiente de potencial indica que ocurre dentro de la región de la membrana donde cae el potencial eléctrico. (Figura 1).

COMPETENCIA CON POTASIO

Antecedentes.

En la sección anterior se vió que compuestos amonio cuaternarios como el TEA son capaces de bloquear la corriente a través del canal de modo dependiente del potencial, sugiriendo que el bloqueador puede penetrar en el poro. En esta sección se darán pruebas que el bloqueo ocurre en la vía de conducción. Si es así, se espera que el K^+ pueda desplazar al bloqueador del sitio de ligamen.

Acción del potasio.

La figura 14 muestra como se afecta la constante de disociación aparente, Kd, al variar la concentración de potasio en el lado cis del canal, lado en que se puso el bloqueador. Esta curva muestra que el bloqueador puede ser desplazado al elevar la concentración de potasio de 100 mM a 400 mM. En este intervalo de concentraciones la constante de disociación a potencial cero cambia de 39±3 mM. a 102±4 mM.

No sólo se puede liberar el bloqueo aumentando el K^+ en el mismo lado que se pone el bloqueador, sino que también hay una liberación del bloqueo cuando se aumenta la concentración de K^+ a ambos lados de la cámara (figura 15). Si se extrapolan los valores de Kd a concentración cero de K^+ se puede determinar una constante de

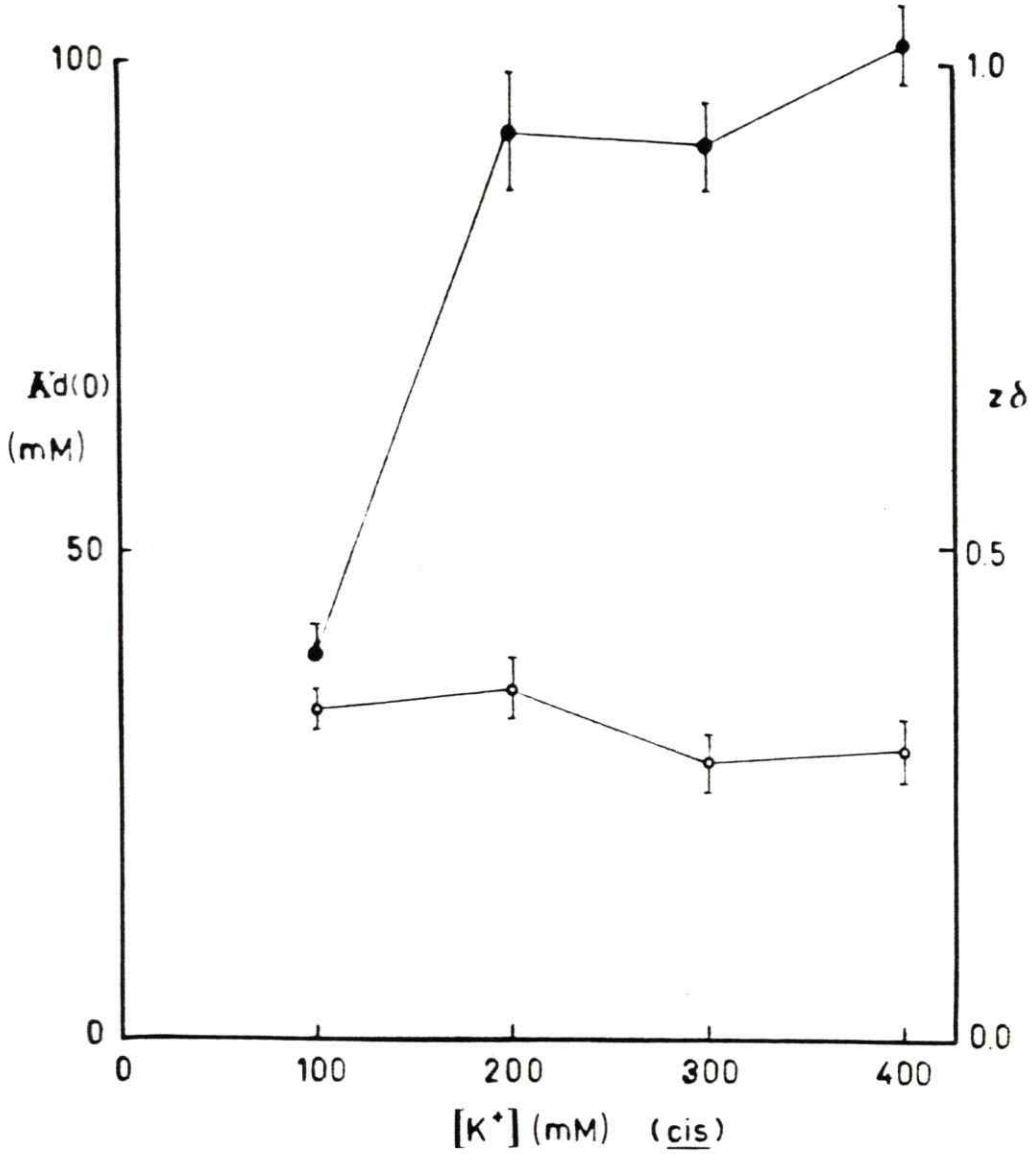

Figura 14
Desplazamiento del bloqueo causado por un aumento en la concentración de K^+ en el lado cis.

En estas condiciones solo se observa un aumento de Kd(0), (●), permaneciendo zδ (O) constante. La concentración de TEA fué de 33 mM. Los canales fueron incorporados en membranas de PE. La concentración de potasio en el lado trans fue de 100 mM.

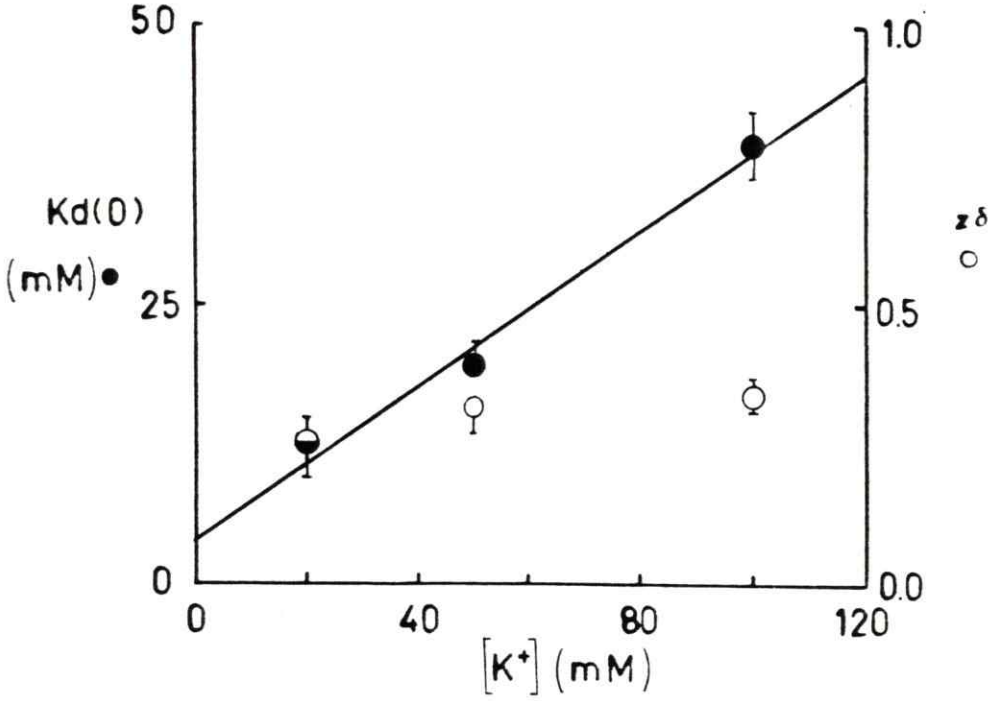

Figura 15
Liberación del bloqueo al aumentar la concentración de K^+ a ambos lados de la membrana.

La constante Kd(0) aumenta (●) proporcionalmente a el aumento en la concentración de K^+. La dependencia de potencial zδ (o) no cambia apreciablemente en ese intervalo de concentraciones. La concentración de TEA a que se midió Kd(0) fué de 33 mM. Canal incorporado en membrana de PE.

disociación absoluta para TEA, su valor es Kd_{abs}=4±2 mM. Este cálculo supone que el sitio de ligamen de bloqueador es el mismo que el sitio de potasio, involucrado en la conducción. Esta suposición es razonable ya que a pesar de que este canal puede aceptar mas de un ion a la vez, a bajas concentraciones de potasio (menores que 100 mM) la probabilidad de tener doblemente ocupado el canal es muy baja (Cechi y col, 1985).

El bloqueo también puede ser liberado cuando se aumenta la concentración de K^+ en el lado opuesto al que se pone el bloqueador. La tabla 2 muestra que la fracción de la corriente trasportada por el canal, en presencia de bloqueador (TEA) aumenta cuando se incrementa la concenterción de K^+ en el lado trans desde 100 a 400 mM.

Conclusiones.

Los resultados anteriores muestran que el potasio es capaz de desplazar al bloqueador de su sitio de ligamen. Esto pone en evidencia que el sitio de bloqueo se encuentra en la via de conducción. La observación que demuestra este hecho es la liberación del bloqueo cuando se incrementa el K^+ en el lado opuesto, ya que lo único que conecta los dos lados de la membrana es la vía de conducción.

Tabla 2

Desplazamiento del bloqueo por TEA debido a un aumento en la concentración de potasio en el lado trans.

K^+_{trans} (mM)	I_o (pA)	I (pA)	I/I_o
100	11.0 ± 0.1	2.7 ± 0.1	0.245 ± 0.01
200	8.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	0.365 ± 0.01
300	7.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.328 ± 0.02
400	5.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.500 ± 0.02

I_o corriente a través del canal en ausencia de TEA. I corriente a través del canal en prescencia de 47 mM TEA puesto en el lado cis. Todas las corrientes se midieron a +60 mV. La concentración de K^+ en el lado cis fue de 100 mM.

BLOQUEO POR COMPUESTOS MONOVALENTES

Antecedentes.

En las secciones anteriores se mostró que los compuestos amonio cuaternarios son capaces de bloquear la corriente que pasa a través del canal de un modo dependiente de potencial. Ademas el sitio a que estos compuestos se ligan está en la via de paso del K^+. Con estos antecedentes es posible iniciar un estudio más detallado de las caracteristicas de la entrada cis del canal.

Bloqueo del lado cis.

La acción del bloqueador es producir una disminución de la corriente, y esta disminución es mayor cuanto más alta es la concentración del compuesto (figura 16).

Para averiguar la estequiometría del bloqueo, se estudió la fracción de corriente I/I_o en función de la concentración de bloqueador, TEA, puesto en el lado cis del canal. Sólo una molécula de bloqueador se une al sitio, según indica la figura 17. La pendiente de esta recta corresponde al valor reciproco de Kd(ec. 33a).

La fig 18 muestra curvas corriente-voltaje en ausencia y en presencia de dos concentraciones de feniltrimetilamonio (FTMA). Esta curva indica que el bloqueo dependiente de potencial no es exclusivo de TEA, y puede ser inducido por

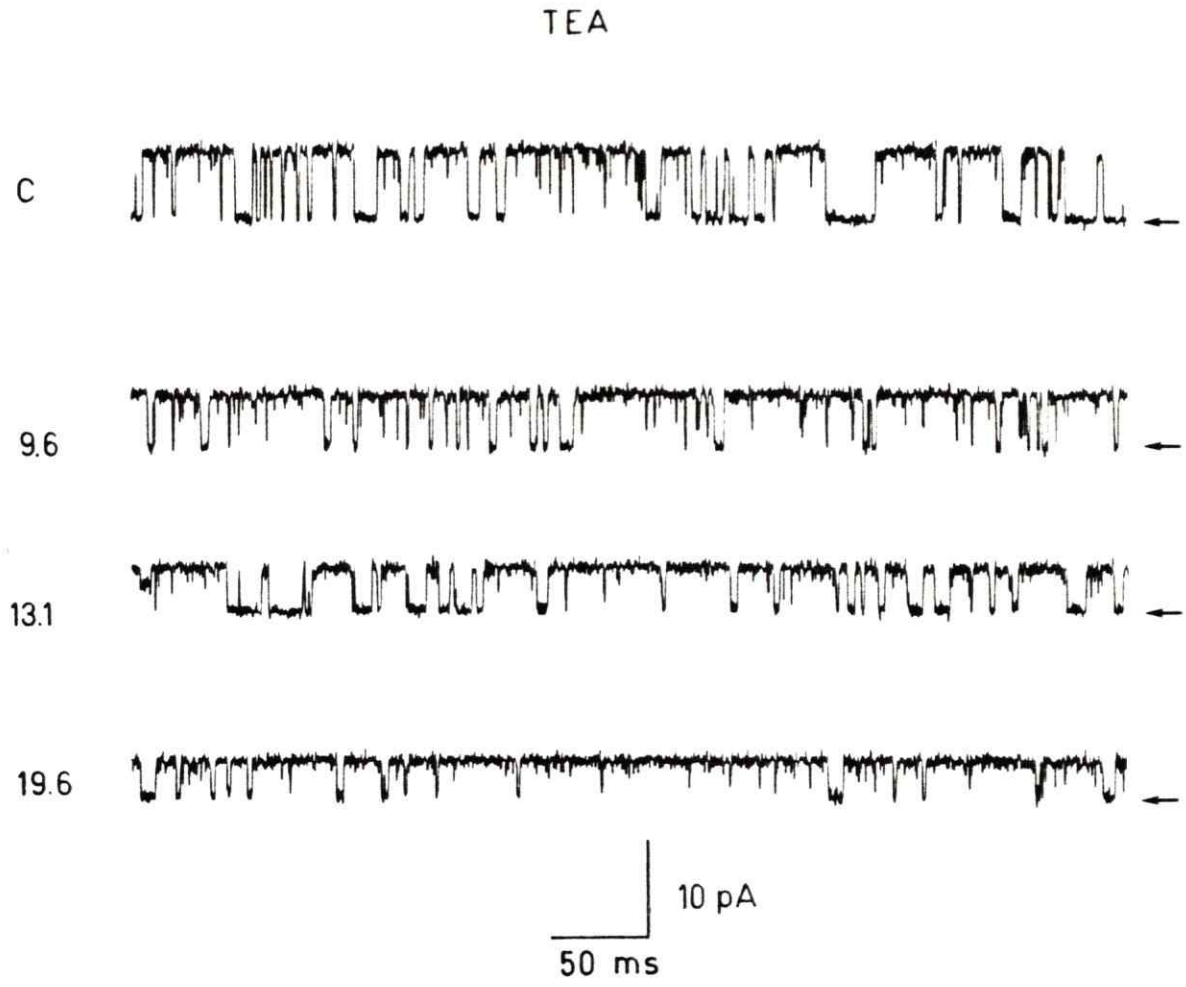

Figura 16
Acción de TEA sobre la corriente.

Registros tomados a +60 mV a las concentraciones de TEA indicadas. C control con 100 mM K^+ a ámbos lados de la cámara. Canal incorporado en una membrana hecha de PE:PS 4:1.

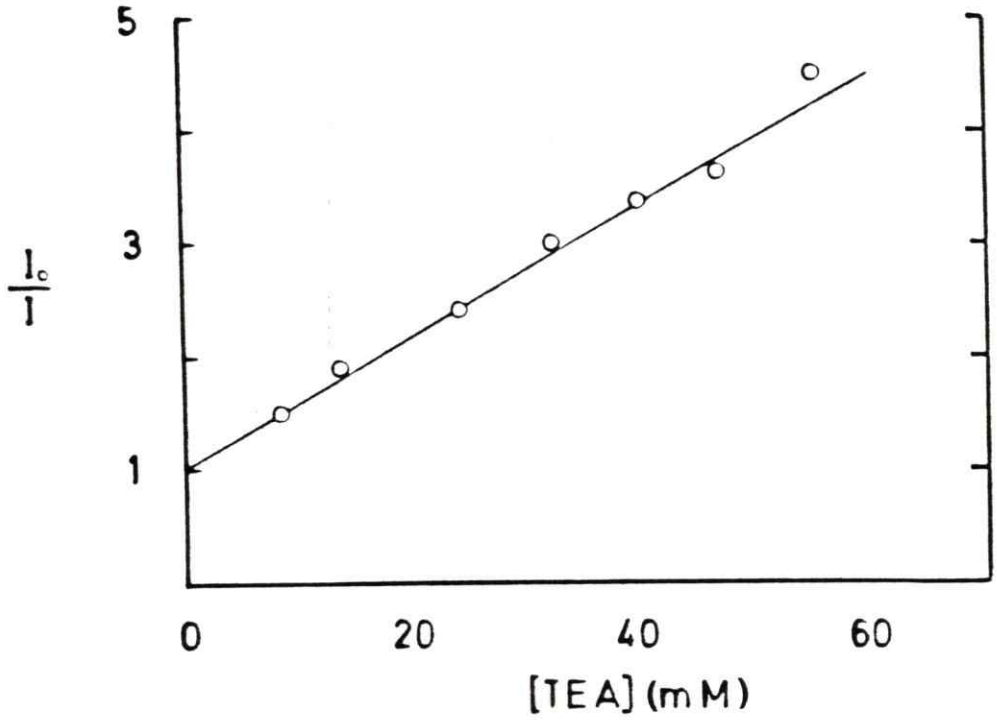

Figura 17
Estequiometría del ligamen de TEA.

La unión de una molécula de TEA al canal predice que I_o/I depende linealmente de la concentracion de TEA, la recta debería tener pendiente 1/Kd(V) e intercepto 1.
Canales incorporados en membranas de PE:PS 4:1 con 100 mM de K^+ a ámbos lados de la camara. Todas las corrientes se midieron a +60 mV.

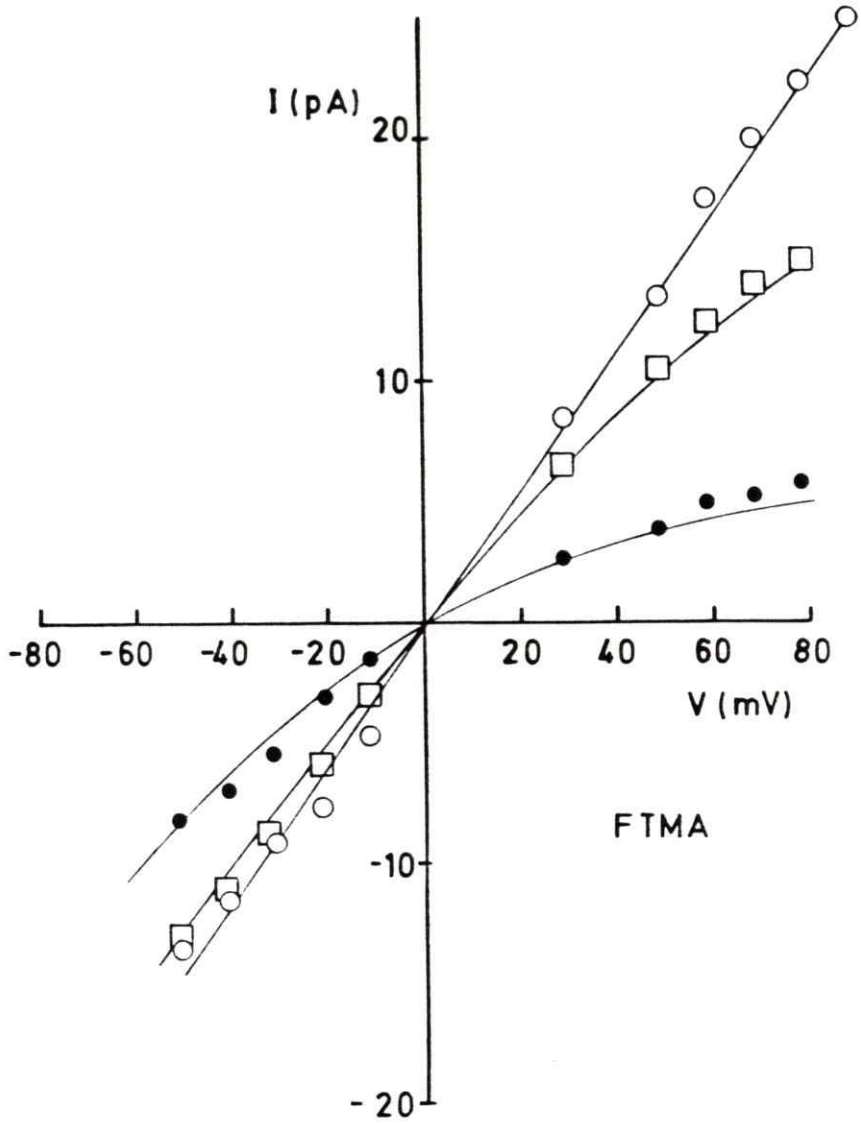

Figura 18
Bloqueo causado por Feniltrimetilamonio (FTMA).

Al igual que TEA el bloqueo es dependiente de potencial, con $z\delta$=0.22. Canal incorporado en membrana de PE:PS 4:1, con 100 mM K^+ a ambos lados. Control (o). FTMA 0.38 mM (□). FTMA 3.0 mM (●). Las lineas corresponden al ajuste de la ecuación 41. Kd(0)=1.6 mM y $z\delta$=0.28 (o). Kd(0)=2 mM y $z\delta$=0.3 (●).

compuestos de estructura relacionada.

Para una serie de sales de amonio cuaternarias, de estructura parecida, se determinó los parámetros de bloqueo Kd(0) y zó. El valor de zó se determinó de las curvas corriente-voltaje a una concentración de bloqueador cercana a la Kd. La tabla 3 muestra los valores de Kd y zó para amonios cuaternarios con diversos substituyentes. Para compuestos de substituyentes hidrocarbonados iguales se puede apreciar un aumento en la afinidad conforme aumenta el tamaño, que en este caso es una medida de la hidrofobicidad del compuesto. El C9 es el compuesto más hidrofóbico de la tabla y tambien el de más afinidad.

Es interesante destacar que el tetrakis a pesar de tener un tamaño parecido al TEA, aunque mucho menos hidrofóbico debido a sus grupos -OH, tiene una afinidad mayor que TEA. Este compuesto parece constituir una excepción a la regla de hidrofobicidad.

Conclusiones.

Los valores de zó son muy parecidos, lo que indica que todos los compuestos bloquean en un mismo sitio, que está localizado a una profundidad que corresponde a un ~27 % del potencial eléctrico aplicado.

Los resultados anteriores muestran que una gran variedad de compuestos relacionados con TEA son capaces de bloquear el canal cuando son puestos en el lado <u>cis</u>, y la

Tabla 3

Parámetros de bloqueo para compuestos monovalentes agregados a el lado cis.

Bloqueador	Kd(0) mM.	zδ	n
Tetrametilamonio	54 ± 6	0.29 ± 0.07	5
Tetraetilamonio	34 ± 7	0.27 ± 0.06	10
Feniltrimetilamonio	1.8 ± 0.2	0.27 ± 0.02	5
Feniltrietilamonio	6	0.21 ± 0.01	4
Tetrabutilamonio	0.5	0.14	1
Noniltrimetilamonio	0.008 ± 0.001	0.4 ± 0.2	8
Tetrakis	29 ± 5	0.26 ± 0.03	3

Los parámetros de bloqeo se calcularon de la corriente relativa según la ecuación 41 usando un algoritmo de ajuste no lineal (véase estimación de parámetros).
Los canales fueron incorporados en membranas hechas de PE:PS 4:1, con 100 mM K^+ a ambos lados de la cámara. La mayoría de las mediciones se hizo en membranas con un solo canal, pero algunas se hicieron con 2 y hasta 3 canales.
n: número de observaciones. Los errores corresponden a la desviación estandar de las medidas.

eficiencia con que lo hacen aparentemente esta dada por el caracter hidrofóbico del bloqueador.

BLOQUEO POR COMPUESTOS DIVALENTES

Antecedentes.

Con el objetivo de estudiar con más detalle las características hidrofóbicas del acceso del lado cis del canal, se estudió el bloqueo para una serie de compuestos divalentes de estructuras relacionadas. Las estructuras de algunos de los compuestos empleados se muestran en la figura 19. Para una serie de compuestos de estructuras similares, como los BisQn, las áreas, y por tanto los largos, son una medida de sus hidrofobicidades (Reynolds y col, 1977, Tanford, 1973). Para estos compuestos BisQn se puede conocer la distancia entre las cargas positivas, midiendo la distancia entre los grupos trimetilamonio usando modelos de Corey-Pauling-Koltun (CPK). La medida del largo de estos compuestos indica su hidrofobicidad.

Bloqueo por iones divalentes.

La figura 20 muestra los valores de las constantes de disociación aparentes Kd(0) para compuestos BisQn de diversos largos de cadena. Puede observarse que la afinidad por el sitio aumenta conforme aumenta el largo de cadena, aún más hay un incremento constante en la energía de unión por grupo $-CH_2-$. El valor de incremento en la energía de unión por grupo $-CH_2-$ es de 311 cal/mol.

Una característica que diferencia a la acción de los

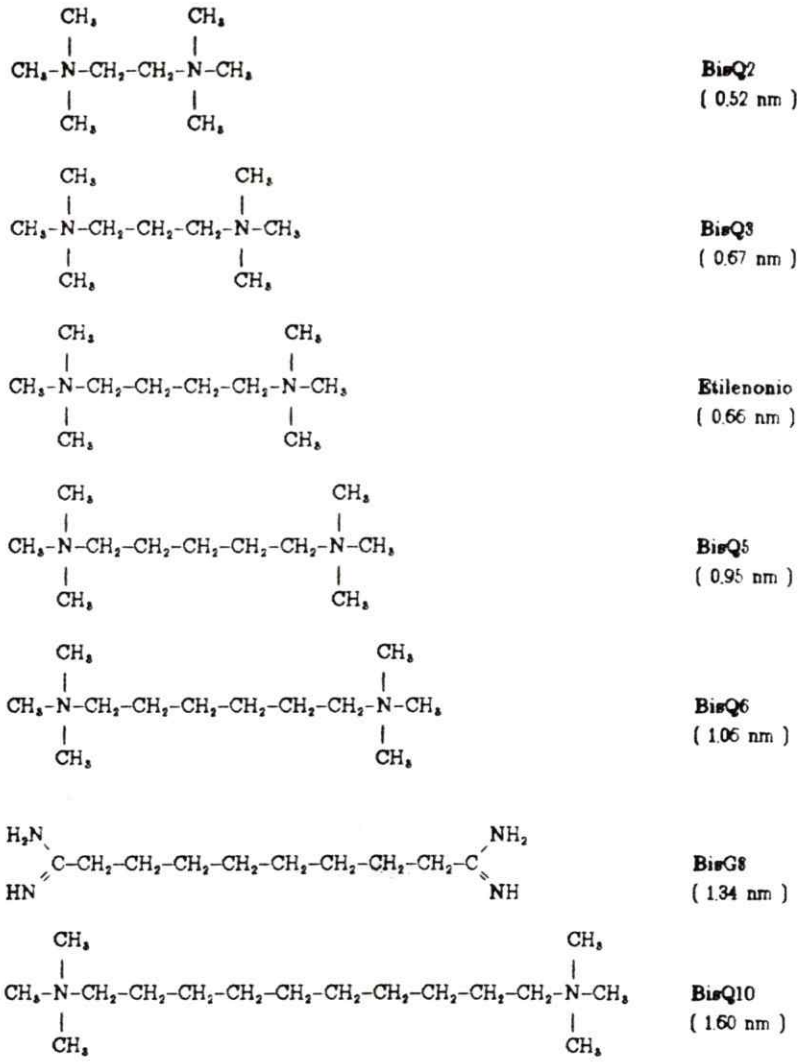

Figura 19
Estructura de los compuestos BisQn y relacionados.

Los números en paréntesis indican la distancia entre las dos cargas positivas. (Determinados usando modelos moleculares de varillas).

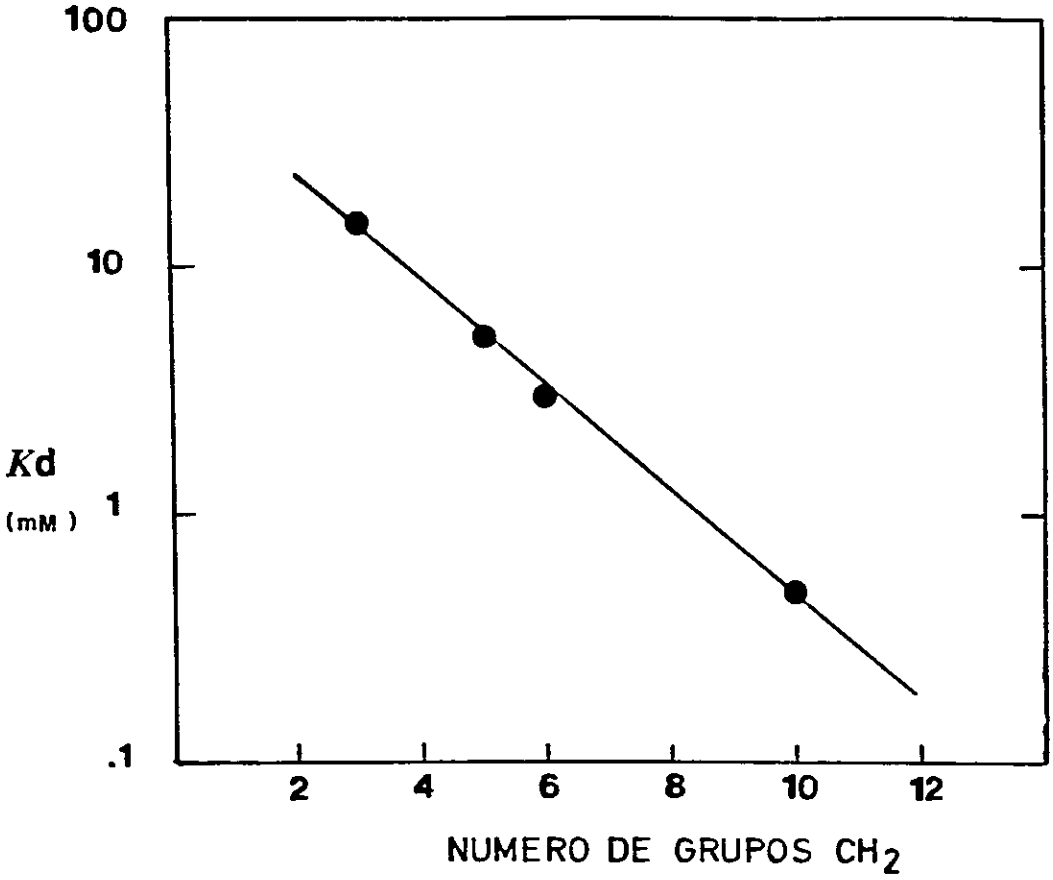

Figura 20
Constante Kd(O) para compuestos BisQn.

Hay un incremento constante en la energía de unión de los compuestos al canal de 311 cal/mol. por cada grupo -CH2-. Kd en escala logaritmica.

bloqueadores divalentes de los monovalentes es que el parámetro zδ depende del largo de cadena del compuesto.

Para cadenas cortas, zδ es mayor que 0.27. Por ejemplo, BisQ2 tiene un valor de zδ= 0.4±0.1. Compuestos de largo de cadena intermedio tienen valores de zδ cercanos al valor promedio encontrado para compuestos monovalentes, para BisQ6 zδ = 0.26 ± 0.03. Compuestos con mas de 8 grupos $-CH_2$ también presentan un aumento en la valencia efectiva, para BisQ10 zδ= 0.55 ± 0.08. En la figura 21 se muestran las distancias eléctricas como función del número de grupos $-CH_2-$. Para largos de cadena muy cortos, ó muy largos, zδ tiende a un valor cercano al doble del valor promedio obtenido para los compuestos monovalentes. Sin embargo para largos intermedios de cadena la distancia eléctrica es similar al valor promedio obtenido para los compuestos monovalentes.

La dependencia anómala de zδ con el largo de la cadena se puede interpretar en términos de la conformación que adopta el compuesto en la entrada al canal (Miller, 1982a). Si el compuesto tiene sus dos cargas positivas muy cercanas deberíamos esperar que bloquee con una dependencia de potencial similar a un compuesto de carga +2, en este caso si las dos cargas se encuentran a la misma profundidad la dependencia de potencial será el doble de 0.27, es decir zδ=0.54. Si se extrapola la

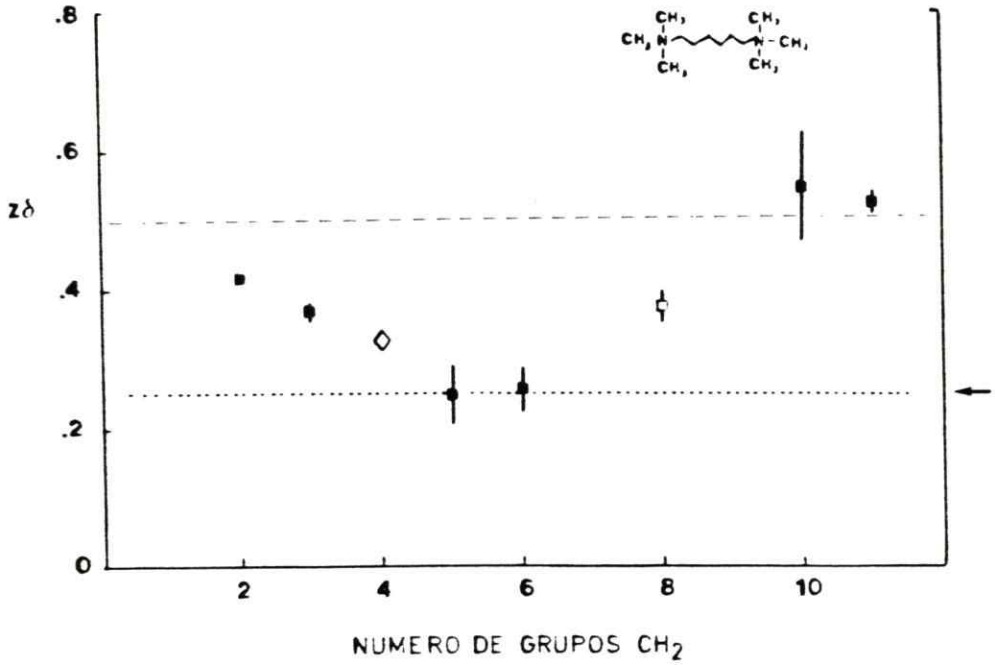

Figura 21
Medidas de bloqueo zδ, para compuestos BisQn y relacionados.

La línea punteada es el valor zδ promedio para los compuestos monovalentes. BisQn (■); 2etilen-1,4-N,N,N,N',N',N'-exametil-bis-amonio (◇); 1,8-bis-(guanidinio)-n-octano (□). Canales incorporados en membranas de PE:PS 4:1 con 100 mM K^+ a ambos lados. Los valores de zδ se calcularon de curvas I/V en presencia de concentraciones de bloqueador cercanas a Kd(0).

dependencia de potencial a cero átomos de carbonos, esto es lo que ocurre. Es decir podemos interpretar la disminucion de z_0 desde un valor de 0.5 a 0.25 como el alejamiento de las dos cargas puestas en el campo (véase Miller, 1982b).

Para el compuesto de cinco átomos de carbono de largo la segunda carga queda fuera de la región donde cae el potencial, y este compuesto se comporta como un ion monovalente típico. El largo de este compuesto es una medida de la longitud del acceso.

Conclusiones.

Los compuestos BisQn bloquean con una afinidad que va de acuerdo con la hidrofobicidad. Esto indica que el sitio donde se unen tiene caracteristicas hidrofóbicas. Según las dimensiones de los compuestos, el sitio de ligamen de los amonios tiene una profundidad de ~1 nm, seguido de una constricción estrecha de menos de 0.5 nm de diamétro. No se puede decir con exactitud cual es el diámetro de la región que acomoda a los amonios ya que de todos los compuestos probados no se encontró uno que no penetre en el poro.

BLOQUEO POR EL LADO TRANS

Antecedentes.

De estudios hechos en el canal de potasio de células cromafines (Yellen, 1984), de células musculares en cultivo (Blatz y Magleby,1984), y de músculo esquelético de conejo (Vergara, 1983) se vió que TEA es capaz de bloquear el lado trans del canal, y con mayor afinidad que el lados cis, por otra parte noniltrietilamonio bloquea con mucho menor afinidad que por el lado cis.

Estos estudios hacen pensar que el lado trans tiene características distintas al lado cis.

Acceso trans.

La figura 22 muestra curvas corriente voltaje en ausencia y presencia de TMA, puesto en el lado trans del canal. La forma de la curva indica que el bloqueo es más intenso a potenciales negativos, es decir en condiciones en que la corriente circula del lado trans al cis. De esta curva se pueden extraer un valor de Kd = 43±8 mM y un valor del parámetro zδ igual a zδ = 0.2±0.05.

La figura 23 muestra curvas corriente-voltaje en ausencia y en presencia de dos concentraciones de TEA, al igual que para el bloqueo por TMA, la disminución de la corriente es mayor a potenciales negativos. Es interesante destacar que las concentracions de TEA requeridas para producir una

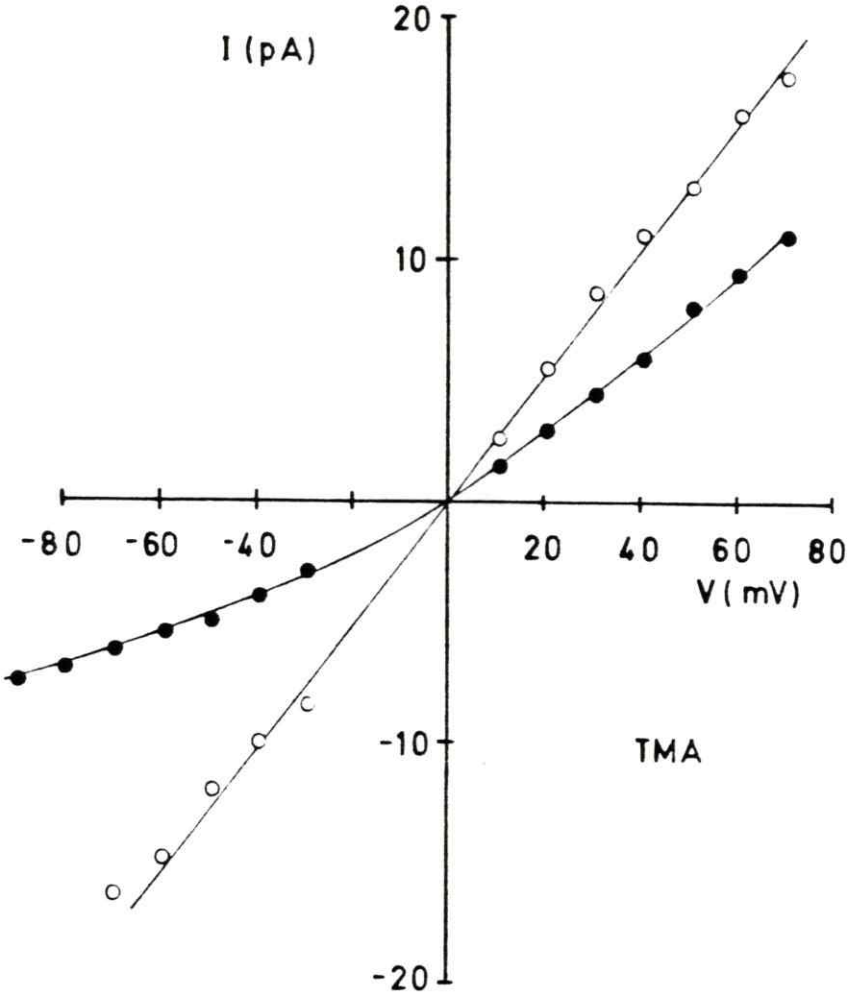

Figura 22
Curva I/V en presencia de Tetrametilamonio (TMA) puesto el lado trans.

Control con 100 mM K^+ a ambos lados (o). Curva con TMA 57 mM (●). Las curvas son simulaciones con los parámetros dados en el texto. Canal incorporado en membrana de PE:PS 4:1.

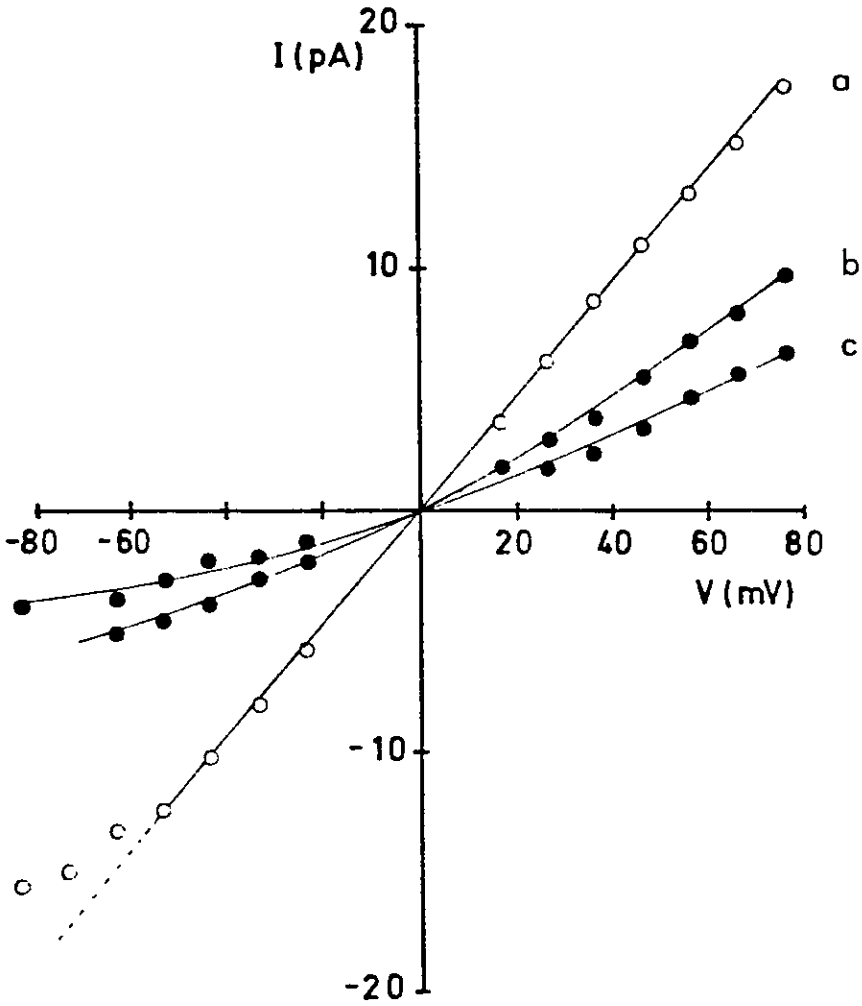

Figura 23
Bloqueo por TEA trans.

En presencia de TEA trans el bloqueo es más efectvo cuando la corriente va del lado extracelular al citoplasmático. Los parámetros de bloqueo son Kd(O)=0.3 mM, zδ=0.14. a) Control. b) TEA trans 0.17 mM. c) TEA trans 0.33 mM. Canal incorporado en membrana de PE:PS 4:1 con 100 mM K^+ a ambos lados de la cámara.

disminución de la corriente comparable a la que produce TMA son cerca de 100 veces menores, indicando que este sitio presenta mayor afinidad por TEA, que por otros amonios cuaternarios.

La tabla 4 muestra los parámetros de bloqueo para el lado trans, para compuestos tanto monovalentes como divalentes. Para compuestos monovalentes de estructura relacionada el acceso trans muestra una especificidad muy alta para TEA, compuestos de mayor o menor tamaño bloquean con afinidades cerca de 100 veces menores.

De un examen cuidadoso de la tabla se puede ver que la profundidad a la que bloquean estos compuestos es variable y aparentemente está dada por su caracter polar. Al igual que el bloqueo por el lado cis los compuestos divalentes muestran un aumento en el valor de $z\delta$ con respecto a los monovalentes, este aumento es inversamente proporcional al largo del compuesto, o al tamaño.

Conclusiones.

Estos datos muestran que el lado trans del canal presenta un acceso que puede alojar diversos compuestos, siendo muy especifico para TEA, por otra parte la entrada al canal presenta características hidrofílicas mas bien que hidrofóbicas, a diferencia del acceso del el lado cis, según se desprende de los valores de Kd para los

Tabla 4

Parámetros de bloqueo para diversos compuestos agregados en el lado trans.

Bloqueador	Kd(0) mM.	zδ	n
Tetrametilamonio	43 ± 8	0.2 ± 0.05	3
Tetraetilamonio	0.12 ± .01	0.13 ± 0.01	5
Tetrapropilamonio	58 ± 4	0.13 ± 0.01	2
Tetrakis	48 ± 5	0.21 ± 0.05	3
BisQ3	6 ± 1	0.48 ± 0.09	3
BisQ4	11 ± 2	0.38 ± 0.09	2
BisQ5	71 ± 3	0.22 ± 0.01	2

Los parámetros de bloqueo se calcularon de la corriente relativa según la ecuación 41, usando un algoritmo de ajuste no lineal (véase estimación de parámetros). Los canales fueron incorporados en membranas de PE:PS (4:1) con 100 mM K^+ a ambos lados de la cámara. n: número de observaciones. Los errores corresponden a la desviación estandar de los valores.

compuestos BisQn.

La constante Kd para el bloqueo por TEA trans es parecida a la determinada en otra preparaciones, tales como células cromafines (Yellen, 1984) ó músculo esquelético de conejo (Vergara, 1983), confirmando el parecido que hay entre los canales de potasio activados por calcio de diversos orígenes.

CINETICA DE BLOQUEO

Antecedentes.

Como se mostró en la sección anterior, el TEA es capáz de bloquear el canal con una gran afinidad. Ademas este compuesto produce un aumento considerable de ruido asociado al estado abierto. Estos hechos hacen de este compuesto la especie ideal para estudiar la cinética de bloqueo usando la distribución de amplitudes, pudiendo de este modo determinar el perfil de potencial del ion en su entrada al canal.

Propiedades cinéticas.

El aumento de ruido de la corriente producido por TEA agregado en el lado trans se muestra en la figura 24. Junto con el aumento de fluctuaciones se observa una disminución de la conductancia. Uno de los supuestos del análisis de la distribución de amplitudes del ruido del estado abierto es que en ausencia del bloqueador el ruido basal tiene una distribución gausiana. En la figura 25 se muestra un histograma del ruido del estado abierto del canal en ausencia de bloqueador, junto con una curva teórica construída con los parámetros del ajuste. Este histograma muestra que el ruído del estado abierto es de distribución gausiana. Para cada condición se construyó un

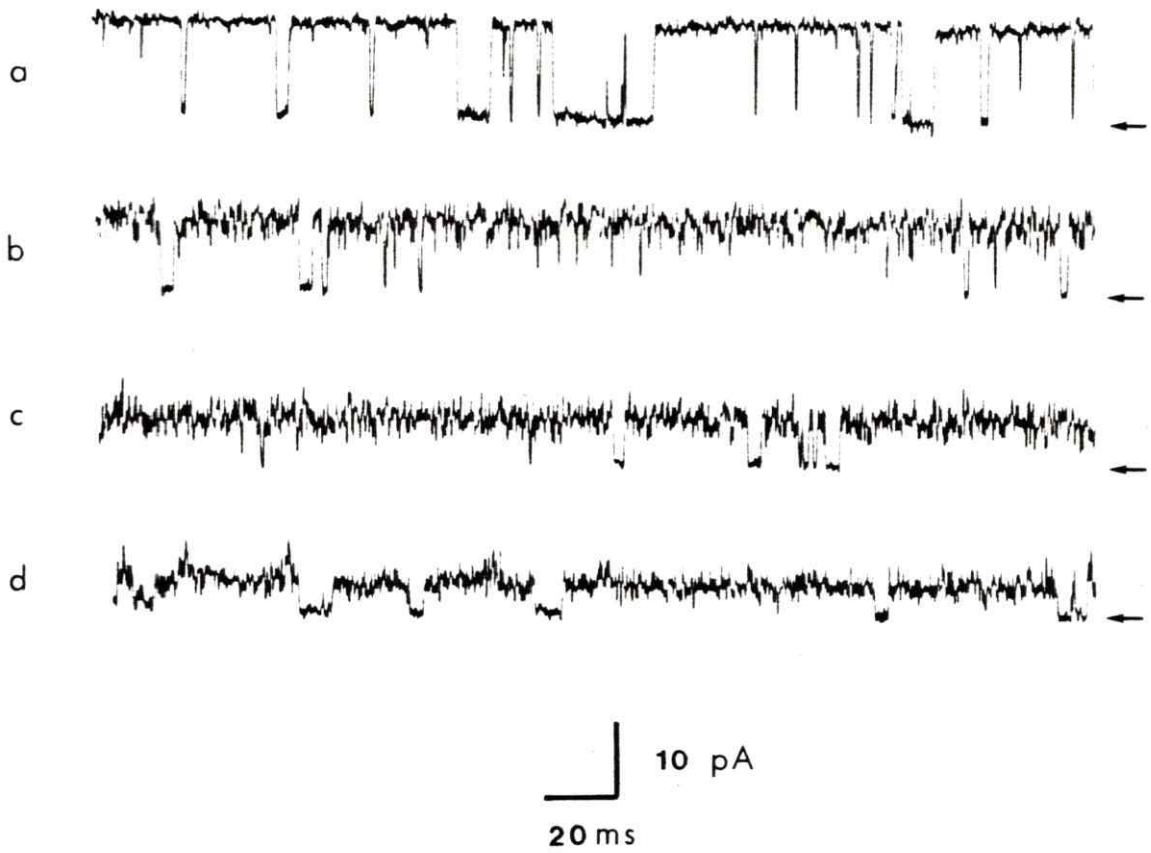

Figura 24
Aumento de las fluctuaciones del canal abierto causadas por TEA agregado en el lado trans.

a) Control. b) TEA 66 µM. c) TEA 232 µM. d) TEA 563 µM. Junto con el aumento de fluctuaciones tambien se observa una notable disminución de la conductancia. Canal incorporado en una membrana hecha de PE:PS 4:1. La flecha indica el estado cerrado.

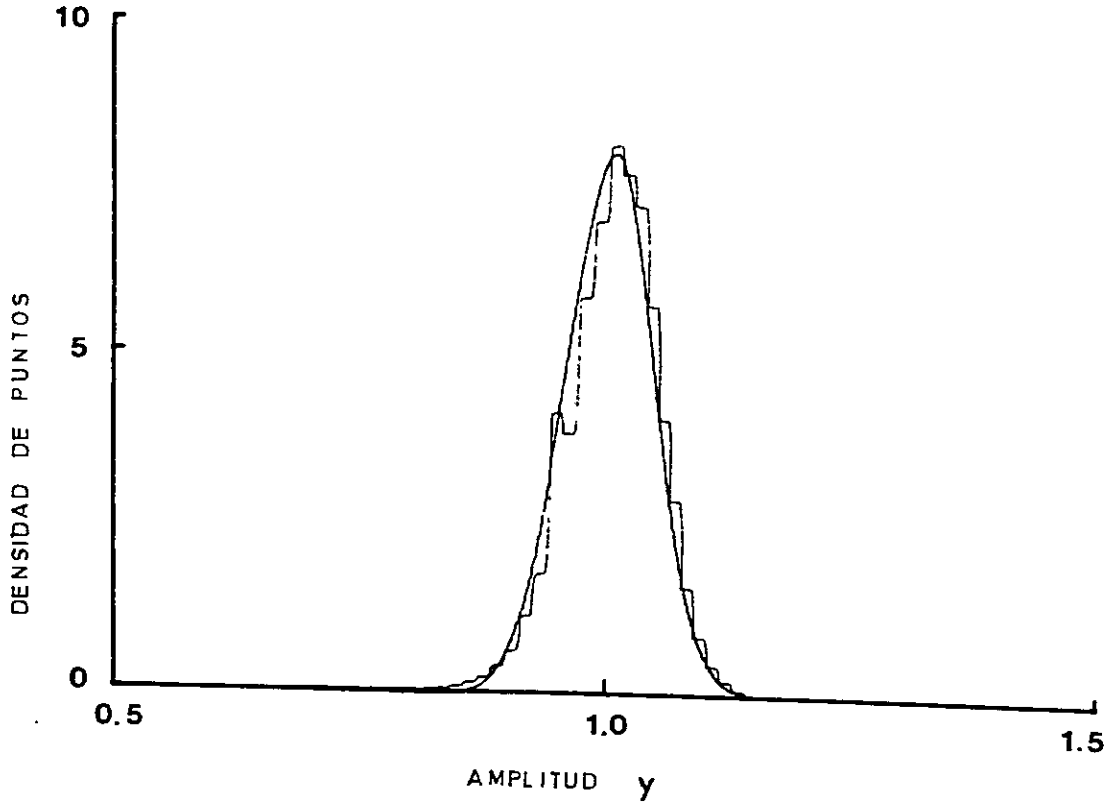

Figura 25
Histograma de amplitudes del ruido del canal abierto en ausencia de bloqueador.

La linea suave es una simulación hecha con los parámetros del ajuste; promedio, μ=0.52, desviación estandar, σ=0.049. Este histograma muestra que el ruido inespacifico tiene distribución gausiana.

histograma control como el de la figura 25 y el valor de sigma obtenido se usó como parámetro fijo en los ajustes de los histogramas obtenidos en presencia de bloqueador, y determinación de las constantes cinéticas.

En la figura 26 se muestra un histograma de amplitudes del ruido de la corriente del canal abierto es presencia de bloqueador, junto con el ajuste usando la ecuación 34. Este fue el experimento típico en la determinación de constantes cinéticas a partir de los histogramas de ruido. Notese que el ajuste es muy sensible al cambio de parámetros, pequeñas variaciónes en estos producen cambios apreciables en la curva. Esto se debe principalmente a que se le impone a la función teórica que tenga área uno.

El efecto del potencial eléctrico sobre las constantes cinéticas de ligamen y liberación es una medida de la simetría de la barrera de energía potencial en el acceso al canal. La figura 27 muestra la dependencia de potencial de las constantes de ligamen y liberación, determinadas de los histogramas de distribución de amplitudes del ruido del canal abierto. Tanto la constante de ligamen β como la de liberación α son dependientes de potencial, para α la dependencia de potencial es δ_1=0.1 ±0.01 y para δ_2=0.05 ±0.01. Estos valores son similares a

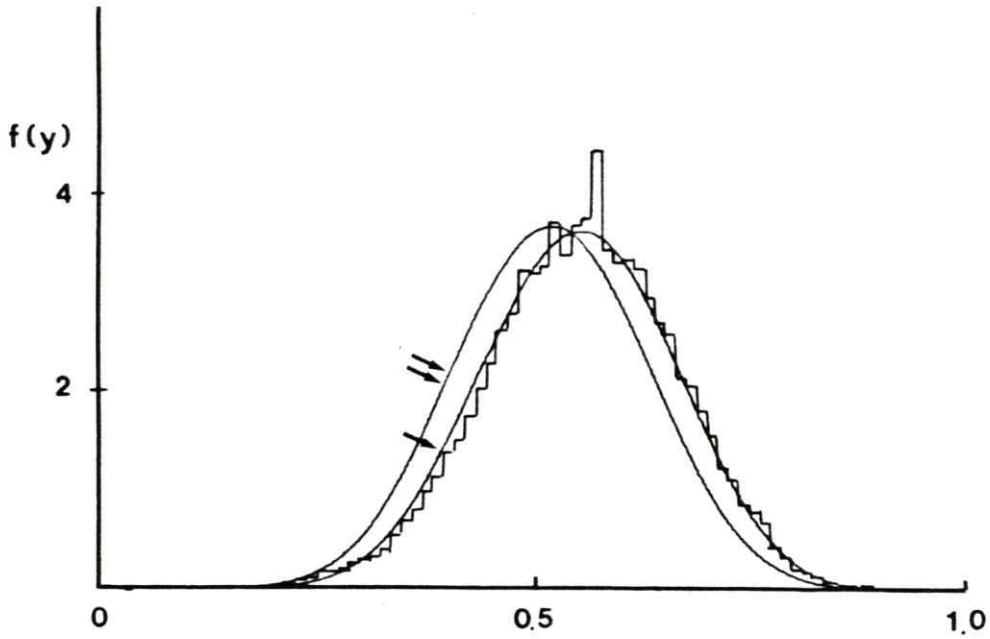

Figura 26
Determinación de las constantes α y β

Histograma de amplitudes de la corriente del canal con 0.2 mM de TEA puesto en el lado trans. Las curvas suaves se construyeron con a=12, b=11 (flecha) y a=12, b=12 (flecha doble). Corriente medida a +60 mV. La concentración de KCl fué de 100 mM a ámbos lados de la cámara. Membrana de PE:PS 4:1.

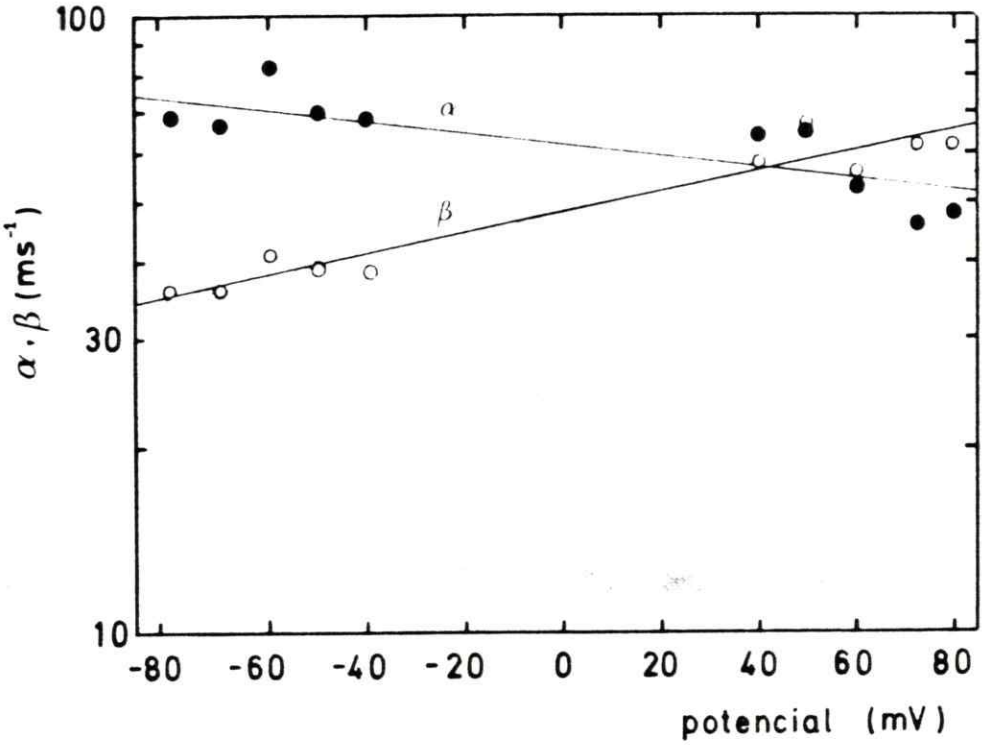

Figura 27
Variación de las constantes de ligamen β, y de liberación α en función del potencial.

De distintos sectores del registro se hicieron sendos histogramas de amplitudes. Se tomaron varios de ellos (4-8) y se promediaron punto a punto. El histograma que resulto de esta operación se entregó al programa de ajuste, obteniendose las constantes cinéticas. (Así cada punto contiene la información de 1-2 s de fluctuaciones de la corriente a través del canal abierto.

los obtenidos de las mediciones en el equilibrio. La suma de los zδ debería corresponder al valor de zδ para la dependencia de potencial de Kd. Ademas $\alpha/\beta'=Kd/[B]$. La comparación de estos valores se muestra en la tabla 5.

El modelo de bloqueo predice que la constante de ligamen debería ser proporcional a la concentración de bloqueador, y la de liberación, debería ser independiente de la concentración de bloqueador. La figura 28 muestra los histogramas de amplitudes del ruido obtenido a +60 mV para diversas concentraciones de TEA puesto en el lado <u>trans</u> del canal. Las curvas muestran un corrimiento de los máximos conforme aumenta la concentración de bloqueador. La figura 29 muestra la dependencia de la concentración de TEA de la constantes de ligamen, β y de la constante de liberación α. Estas dependencias son como las predice el modelo de bloqueo propuesto.

La relación entre las dos constantes cinéticas está muy bien estimada, ya que es sensible a la posición del máximo del histograma de amplitudes. Los valores absolutos de estas son sensibles al ancho del histograma y al valor de la constante de tiempo del sistema de medición, que es necesario medir con bastante precisión.

Tabla 5

Comparación de los parámetros del bloqueo inducido por TEA (trans) medidos de la disminución de conductancia del canal y de los histogramas de amplitudes.

Parámetro	Kd	zδ
Disminución de conductancia	0.12[a] ± 0.01	0.13[b] ± 0.01
Histograma de amplitudes	0.128[c] ± 0.005	0.15[d] ± 0.01

Comparación de lo parámetros de bloqueo según la ecuación 10. a)calculado de la razón entre las constantes cinéticas, de los valores antes indicados. b)suma de las dependencias de potencial de la constante de ligámen y liberación segun la figura 1. c) y d) tomado de la tabla 4.

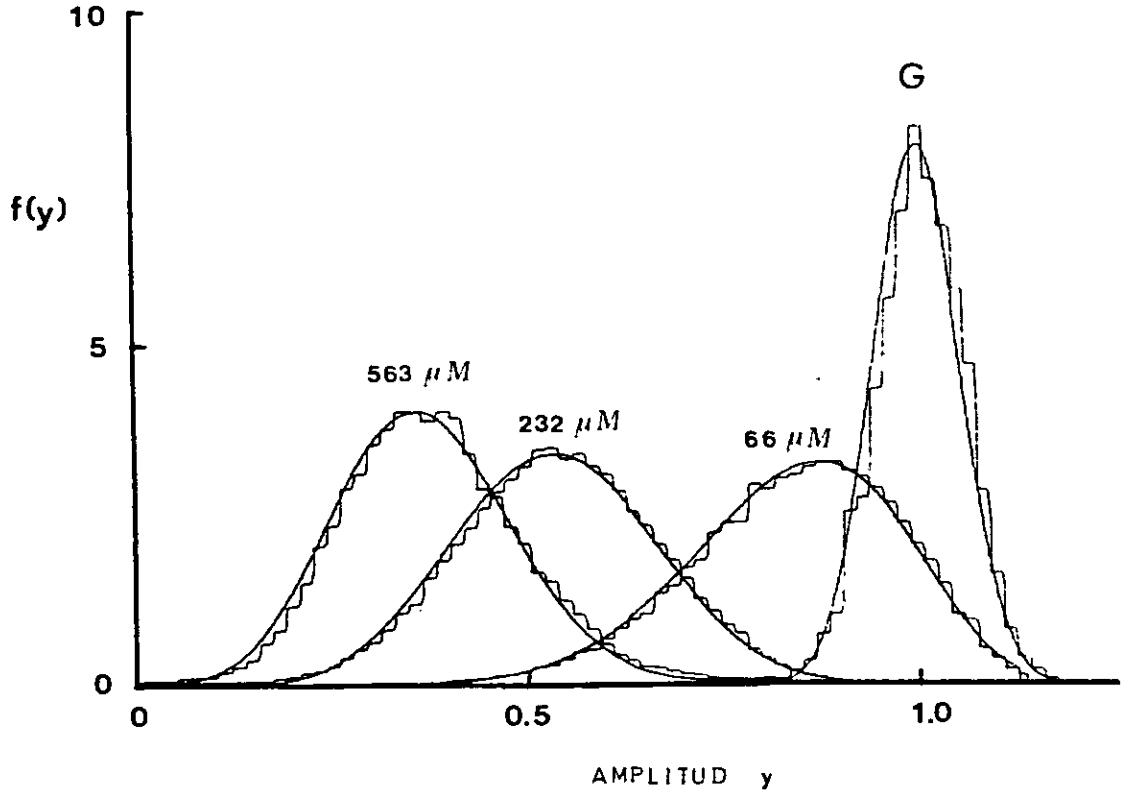

Figura 28
Histogramas de amplitudes a distintas concentraciones de TEA, puesto en el lado trans.

Canal incorporado a membrana de PE:PS 4:1 con 100 mM K^+ a ambos lados de la cámara, contruida en agujero pequeño, capacidad 50-80 pF. G) histograma control. La linea suave es el ajuste de una función gausiana.

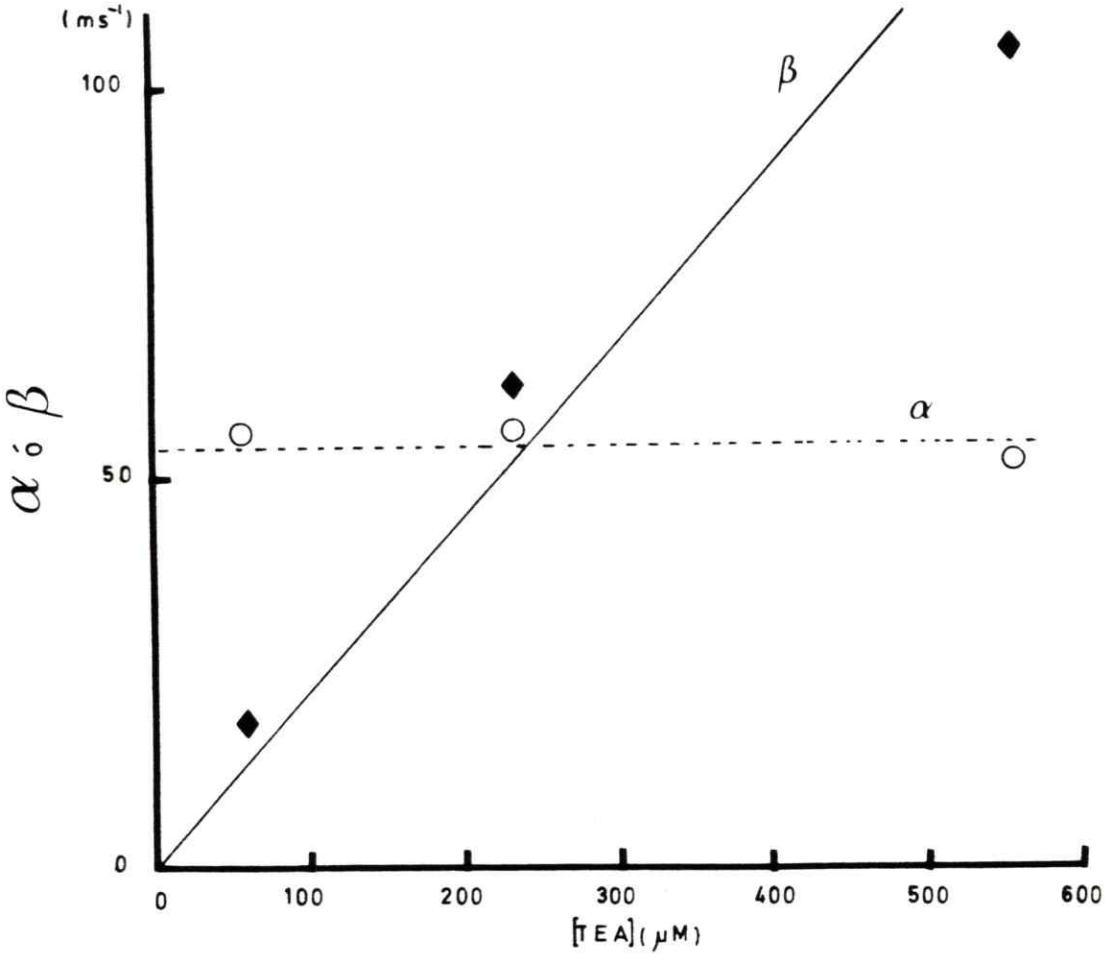

Figura 29
Variación de las constantes cinéticas de ligamen β y de liberación α en función de la concentración de TEA.

Ambas constantes se calcularon a partir de histogramas como los mostrados en la figura 25. Constante de ligamen β (♦). Constante de liberación α (O).

Conclusiones.

Los resultados anteriores muestran que la disminución de corriente y el aumento del ruido son explicables en términos de la reacción de ligamen-liberación del bloqueador y las propiedades del conversor corriente voltaje, que en este caso está completamente caracterizado por su respuesta de tiempo τ=200 µs.

La constante de ligamen β' es dependiente de la concentración de bloqueador, no así la constante de liberación α.

Ambas constantes, α, β' son dependientes del potencial eléctrico. Para el ligamen $z\delta_1$=0.05 y para la liberación $z\delta_2$=0.1 (véase figura 1).

DISCUSION

Origenes del efecto del potencial eléctrico sobre el bloqueo.

Las mediciones de las dimensiones de los accesos se basan en el hecho de que el ion penetra en el poro. Por lo tanto antes de interpretar cualquier resultado es importante analizar con cierto detalle los mecanismos que generan bloqueo dependiente de potencial y descartar otras causas distintas de la penetracion del ion en el campo eléctrico, que puedan producirla.

El parámetro que mide el efecto del potencial sobre el bloqueo, zδ, por si solo, no demuestra que el ion bloqueador puede penetrar en el interior del canal. La dependencia de potencial puede deberse a otras causas, que se analizarán a continuación.

Moczydlowski estudio el bloqueo inducido por derivados de la saxitoxina en el canal de sodio de túbulo tranverso. Estos derivados tenian distinta carga. Moczydlowsky observo que todos bloqueaban con la misma dependencia de potencial zδ. Estas observaciones lo llevaron a postular que el bloqueador induce cambios conformacionales en la proteina para llevarla a un estado no conductor (Moczydlowski y col, 1984). El estado bloqueado sera más favorecido cuanto

más favorecidos por el potencial sean los movimientos de los grupos cargados.

En nuestro caso este mecanismo se descarta inmediatamente ya que la distancia eléctrica si depende de la carga del compuesto bloqueador.

Se ha sugerido que el canal de potasio activado por calcio puede aceptar más de un ion a la vez en su sistema de conducción, (Vergara y col., 1983; Yellen, 1984; Eisenman, Latorre, Miller resultados no publicados). Es posible entonces que el ion bloqueador coexista con uno o más iones potasio en el interior del canal. Supongamos que el bloqueador no penetra en el poro, sino que se liga en la entrada al canal con una cierta afinidad. Supongamos que la salida del bloqueador se debe a la repulsión eléctrica con el potasio. Asi se puede cambiar la afinidad del bloqueador variando la probabilidad de ocupación del sitio de potasio. Lo potenciales que favorecen la ocupacion liberan el bloqueo, a su vez, aquellos potenciales que disminuyen la ocupacion intensifican el bloqueo. Luego podemos tener un bloqueo dependiente de potencial.

Si ocurriera el mecanismo anterior, se esperaría que al disminuir la concentracion de potasio, en ambos lados de la cámara, la probabilidad que el potasio ocupe el canal disminuyera. Asi el bloqueo se haria independiente

de potencial a bajas concentraciones de potasio. Este fenómeno no ocurre al menos hasta 20 mM potasio, según se mostró en la figura 14.

Los argumentos anteriores, más el hecho que el bloqueo disminuya al aumentar la concentración de potasio en el lado opuesto al que se agregó el bloqueador, indican que estos compuestos pueden penetrar en el sistema de conducción de potasio. Estas observaciones hacen de los amonios cuaternarios una herramienta útil en el estudio de la arquitectura de las vías de acceso al canal.

Acceso citoplasmático

El bloqueo producido por todos los compuestos monovalentes, aplicados por el lado cis, es dependiente de potencial eléctrico y puede ser descrito con un $z\delta=0.27$. Esto sugiere que todos se unen a un mismo sitio de ligamen. El hecho que el bloqueo producido por compuestos pequeños, como el TMA, pueda ser descrito con el mismo $z\delta$ que otros más grandes indica que no existe una disminución gradual del radio de la entrada al canal, sino más bien una gran entrada seguida de una abrupta constricción de menos de 0,25 nm de radio (radio del TMA). Esto también se concluye de la observación que los compuestos de igual tamaño pero distinta hidrofobicidad, como lo son el TEA y el Tetrakis, bloquean en la misma posición, y este último

no tienen acceso a zonas más profundas en el canal.

Una relación entre la distancia eléctrica y la distancia geométricase puede obtenerse de la interpretación de los valores de zδ para compuestos divalentes. Ya que los diferentes compuestos monovalentes se ligan en la misma posición, independiente de su estructura, podemos suponer que uno de los grupos cargados de los compuestos divalentes se unirá a una distancia eléctrica igual a la de los monovalentes, y la otra carga se ubicará a una distancia igual al largo de la cadena hidrocarbonada. El BisQ5 se comporta como un ion monovalente (zδ=0.26) (figura 21), por lo tanto la segunda carga debe quedar fuera del campo. El largo de este compuesto es de ~0.96 nm., esta es la distancia geométrica que corresponde a una distancia eléctrica zδ=0.27. Para compuestos BisQn la segunda carga se ubicará a una distancia

$$d = 0.96 - l \text{ nanometros.}$$

en que l es el largo de cadena en nm. Así de los valores de zδ de puede determinar cómo varía el potencial en función de la distancia (figura 30).

Los compuestos BisQn de cadena larga pueden adoptar una conformación no extendida (Miller 1982a). Dentro del canal pueden tomar la forma de herradura, como se desprende de la observación que los valores de zδ aumentan con respecto

al valor promedio para compuestos monovalentes. Es decir las dos cargas se encuentran más juntas de lo que predice el largo de cadena. La posibilidad de que los compuestos BisQn de cadena larga adopten forma de herradura en el interior del acceso cis no sólo corrobora sus características hidrofóbicas sino que nos da una estimación del tamaño de la cavidad.

Los resultados obtenidos con los compuestos BisQn indican que la transferencia del compuesto al sitio de ligamen estaría gobernada por el efecto hidrofóbico. El valor de 311 cal/mol en el incremento en la energía de unión, por cada grupo CH_2- es comparable al valor de 310 cal/mol encontrado por Miller para el canal de potasio del retículo sarcoplásmico. Este no es exactamente un efecto hidrofóbico clásico. Las energías obtenidas son cerca de la mitad de las que indica Tanford (Tanford, 1980). En el terreno de la especulación podríamos decir que es sólo un lado del compuesto el que se adosa al canal, de tal modo que el área a considerar sería la mitad. De lo que se puede tener certeza es que el acceso cis es hidrofóbico.

Cabe preguntarse entonces si el acceso cis es un dominio completamente hidrofóbico expuesto hacia la solución. Hay pruebas de que no lo es. Si bien es cierto que el acceso cis se comporta como una zona hidrofóbica en

la que se "disuelven" los residuos hidrocarbonados de los bloqueadores, hay también otro tipo de interacciones involucradas, como lo indican los resultados obtenidos con tetrakis. El tetrakis es un compuesto similar al TEA en que uno de los hidrógenos de cada grupo metilo ha sido reemplazado por -OH. Este compuesto tiene una Kd(0) de 29 mM, en comparación con el TEA, cuya constante Kd(0) es de 34 mM. Estas observaciones indican que interacciones de un tipo distinto que las hidrofobicas podrían ser importantes en la estabilización del ion en su sitio de ligámen.

Acceso trans.

En este lado el bloqueo nos enseña que el acceso tiene caracteristicas polares. Los compuestos más hidrofílicos tienen mayor afinidad. A diferencia de lo que ocurria en el lado cis al alargar la cadena de los compuestos BisQn su afinidad disminuye.

Llama la atención la alta afinidad del TEA en comparación con TMA o TPA. Al parecer el TEA queda inmovilizado en el acceso al canal. Esta afirmación se apoya en el modo distinto de bloqueo; el de producir aumento de ruido en la corriente a través del canal abierto. Esto nos dice que los tiempos de permanencia del TEA en el sitio de ligamen son mayores que los de TMA o TPA.

El bloqueo por TEA nos está indicando que el diámetro del acceso trans es probablemente de 0.6-0.8 nm, ya que compuestos menores penetran más al interior (TMA) en cambio compuestos de mayor tamaño bloquean en la misma posición.

Para determinar el largo del acceso trans podríamos usar los valores de zó de los compuestos BisQn como se hizó para el lado cis. En este lado la suposición de que todos los compuestos monovalentes bloquean en la misma posición no se cumple. Para hacer la estimación supondremos que la primera carga de los compuestos BisQn se une en la posición del TMA (zó=0.2). El error que se comete con los derivados mas hidrofóbicos de debe a que estos penetran menos en la vía de conducción, es decir la segunda carga del compuesto BisQn quedará fuera del campo para un largo menor que el largo del acceso, en ningún caso mayor. Por lo tanto el largo calculado de ~0.96 nm está subestimado.

Los valores de la fracción del potencial en función de la distancia (en manometros) se muestran en la figura 30. Tomando en cuenta las observaciones hechas para el lado trans, la curva describe el potencial en las entradas del canal.

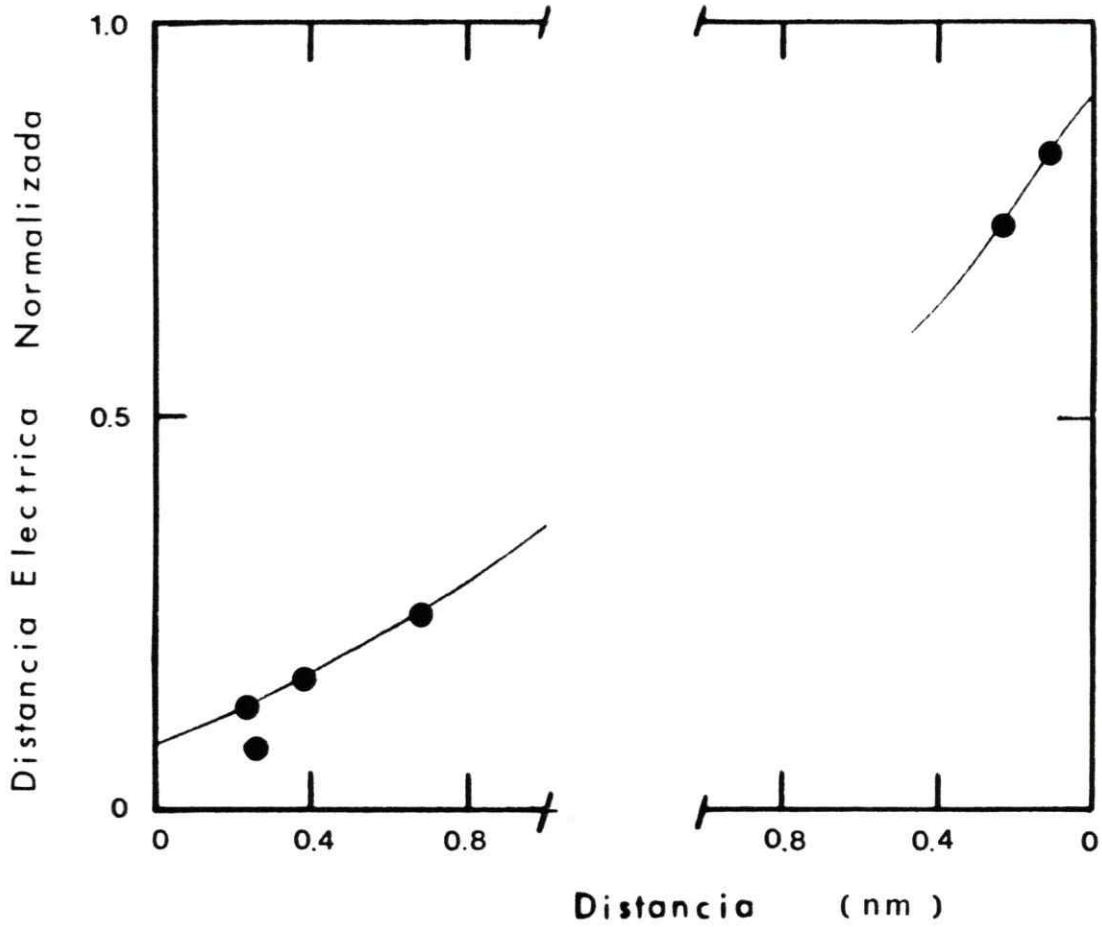

Figura 30
Perfil de potencial en las entradas al canal, determinados de los valores de zó para los compuestos BisQn.

Los puntos graficados corresponden a zó, en función del largo de cadena en nanometros La curva no corresponde a ningun modelo teórico.

Arquitectura de las vias de acceso.

Con el uso de bloqueadores de la corriente que circula a través del canal se ha podido determinar que éste tiene dos accesos amplios de cerca de 1 nm cada uno. De este modo en la mayor parte de la via de conducción el ion se puede mover libremente, como en la solución. Esta caracteristica estructural permite al canal tener una gran conductancia (figura 31). La combinacion del uso de bloqueadores monovalentes de diverso tamaño, y el uso de los compuestos BisQn ha mostrado ser una técnica muy apropiada. Los compuestos BisQn miden fundamentalmente profundidad, y los monovalentes el radio del poro.

En el presente trabajo se ha podido determinar la estructura global de los dos acesos al canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético. Conviene recalcar una vez más que las dos entradas son fundamentalmente distintas. El acceso cis es principalmente hidrofóbico pero posee grupos capaces de formar puentes de hidrógeno. El acceso trans, en cambio es más pequeño que el cis y más polar.

Una de los resultados más interesantes es que una gran parte del poro lo constituyen los accesos. La región donde el ion toma contacto estrecho con la proteina parece ser una pequeña parte del total de la via de conducción. El aporte del presente trabajo ha sido mostrar que los

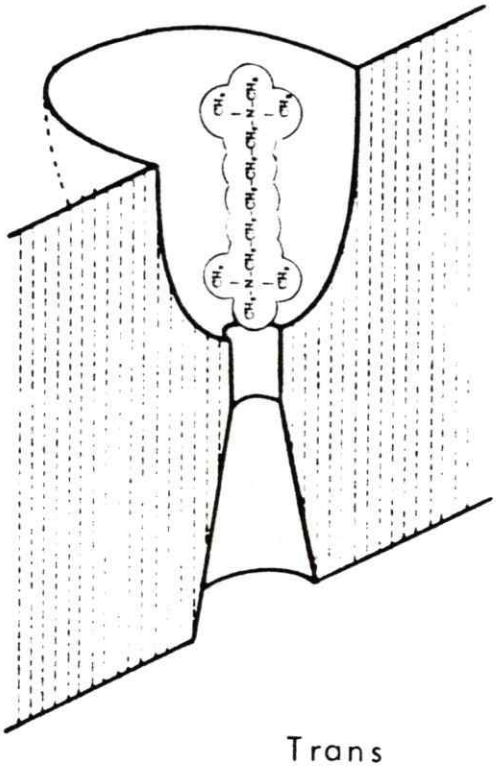

Figura 31
Modelo de la region del canal donde cae el potencial.

En el acceso <u>cis</u> se muestra un compuesto BisQn.

accesos postulados existen y dar las dimensiones. Cabe mencionar que la idea que hasta ahora se tenía de la región donde cae el potencial ha cambiado. Miller postula que la región donde cae el potencial tiene un diámetro uniforme (Miller 1982b) y que en los accesos no cae el potencial. La idea que parte del potencial podía caer en los accesos la postuló Peter Jordan (Jordan, 1984) en base a un modelo electrostático de un poro. Con las técnicas empleadas aquí se ha mostrado que, de acuerdo a lo predicho, una fracción considerable del potencial cae en los accesos. Cerca de un 50 % del potencial cae en las entradas del canal. Si se considera a los accesos como resistencias en serie con el poro, a este último le corresponde una conductancia de 460 pS. Este es la conductancia de un poro acuoso lleno de una solución 0.1 M de KCl 0.2 nm de radio y 0.35 nm de largo, lo que no necesariamente significa que ésta sea la estructura de la region más estrecha.

Comparación con otros canales

Tanto el receptor de TEA interno (cis) como el externo (trans) presentan notables parecidos a los descritos en otros canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (Blatz y Magleby, 1984; Yellen, 1984), ambos canales estudiados en células. En el lado

intracelular Blatz y Magleby encontraron una Kd(O)=60 mM (determinado con 160 mM K^+ a ambos lados de la membrana), Yellen encontró Kd(O)=24 mM (con 160 mM K^+ dentro de la célula, y 160 mM Na^+ externo). Con respecto a las distancias eléctricas, zδ, Blatz y Magleby encontró zδ=0.26, valor muy parecido al determinado aqui, en cambio Yellen encontró zδ=0.1.

Con respecto al lado extracelular ambos autores encontraron que el TEA era mucho más efectivo que cuando se aplicaba por el interior de la célula. Blatz y Magleby encontraron Kd(O)=0.3 mM, y Yellen encontró zδ=0.2 mM, ámbos valores muy parecidos a los determinados en este trabajo. Estos datos contribuyen más a demostrar el parecido que hay entre los distintos canales de potasio de alta conductancia activados por calcio.

Estudios detallados de bloqueo hecho en ámbos lados de canales de potasio de alta conductancia no se conocen, en otros canales de potasio los estudios tambien son escasos, salvo el hecho por Hille y colaboradores en nodo de Ranvier (Armstrong y Hille, 1972). Este grupo usando n-alquil trimetilamonio, como bloqueador de las corrientes de potasio, encontró que tanto por el exterior como por el interior del nodo habian receptores para TEA. Estos eran distintos. El receptor interno era más afin por los compuestos mas hidrofóbicos, no asi el externo que

preferia los menos hidrofóbicos. Por otra parte el TEA aplicado externamente bloqueaba en concentraciones de 1 mM, en cambio por el interior se requerian concentraciones de 20 mM para reducir la corriente en un 60 %.

Es interesante destacar el parecido entre otros canales de potasio y los de alta conductancia activados por calcio. El ejemplo anterior en nodo de Ranvier muestra que no sólo se comparte la capacidad de ser bloquados por TEA sino tambien la diferencia de afinidades relativas entre el interior y el exterior de la célula.

Cinética de bloqueo.

Las mediciones en el equilibrio nos dan una caracterización estructural del canal, que es estática, las mediciones cinéticas nos dan una idea de la velocidad con que entra y sale un ion del acceso, que es como la antesala de la vía de conducción. Las mediciones cinéticas usando el análisis de distibución de amplitudes de la señal filtrada permite medir cada una de las constantes cinéticas, aún cuando no sean distinguibles los estados abierto y bloqueado. Debe notarse que el esquema cinético planteado tiene dos estados, abierto y bloqueado, ya que en este estudio no se consideró la interacción del bloqueador con el canal cerrado. Tanto las mediciones cinéticas como las mediciones en el equilibrio se hicieron

con el estado abierto.

La constante cinética de ligamen β depende linealmente de la concentración de TEA, no así la de liberación, α que permanece constante al aumentar la concentración de bloqueador (Figura 26).

Se ha visto que ambas constantes dependen de potencial. La entrada de TEA al sitio del lado trans depende de un 5% del potencial, en cambio la salida depende de un 10 % del potencial total aplicado. El origen de la asimetría del perfil de energía para el TEA en su entrada al canal requiere un estudio más detallado, en que se considere la acción de potasio sobre éstas. Este estudio permitiría determinar si hay competencia estricta, en cuyo caso la constante β debería depender de la concentración de potasio, ó repulsión electrostática, en cuyo caso la constante de liberación, α, debería depender de la concentracion de potasio.

Los valores de las constantes cinéticas de ligámen y liberación a potencial cero son 48 y 63 ms^{-1} respectivamente. Estos valores corresponden a energías de activación de 18 kT para la liberación y 20 kT para el ligamen de TEA. Estos valores obtenidos son razonables, y son mayores que las energías involucradas en el movimiento de cationes alcalinos a través del canal de hemocianina (Cecchi y col, 1981) o a través del canal de potasio

activado por calcio de células cromafines (Yellen, 1984), pero son menores que el ligamen de Decametonio, al canal de potasio de reticulo sarcoplásmico, en que que la energía de activación es del orden de 25 kT (Miller 1982a).

¿ Es posible entender la alta conductancia ?

Los resultados obtenidos contribuyen a entender la alta conductancia de los canales de potasio activados por calcio. La observación más importante es que el poro a través del cual se conducen los iones está estructurado como dos accesos que en conjunto cubren ~2 nm del total de la vía y una zona estrecha, no accesible a los bloqueadores del tamaño probado. En estos accesos reside cerca de la mitad de la resistencia total del canal.

El hecho que los accesos sean amplios no sólo facilita la colisión del ion con la entrada del canal, sino que ayuda a disminuir la energía de polarización (Levitt, 1978). Parte de la energía para transferir el ion al poro se debe a la polarización de las paredes de éste. Esta energía disminuye con el aumento del radio y disminución del largo (Levitt, 1978). Podria decirse que en lo que se refiere a efectos electrostáticos el poro se comporta como si tuviera un gran radio, ya que la

constricción es una pequeña parte del total.

Los cálculos de Levitt de energía de polarización están hechos para poros de radio uniforme (Levitt,1981), aunque se conocen modelos para calcular la contribución electrostática a la energía de un ion en un poro estructurado, es decir de radio no uniforme, una interpretacion en términos más cuantitativos de la energía del ion dentro del canal de potasio activado por calcio de alta conductancia tendrá que esperar a que se conozcan datos de las dimensiones de la parte más estrecha del poro, el filtro de selectividad.

Conclusión final.

El estudio de la interacción del canal de potasio activado por calcio con cationes orgánicos nos ha mostrado aspectos importantes de la morfología del sistema de conducción de iones de esta proteína intrínseca de membrana.

El uso de estos compuestos permite determinar no sólo la polaridad de las zonas de acceso al canal, sino tambien sus dimensiones moleculares. Los compuestos BisQn usados actuan como verdaderas cargas de prueba que determinan el potencial en las entradas del canal.

La región donde cae el potencial a través del poro no tiene un diámetro uniforme, y la región más estrecha es

una pequeña parte del total de la vía de conducción, esta característica nos ayuda a entender la alta conductancia de los canales de potasio activados por calcio.

El uso de la distribución de amplitudes de la señal filtrada nos permitió conocer la velocidad de entrada y salida de un ion al canal.

Coronado, R. y Miller, C. 1979. Voltage-dependent caesium blockade of a cation channel from fragmented sarcoplasmic reticulum. Nature, 280: 807-810

Coronado, R. y Miller, C. 1980. Decamethonium and Hexamethonium block K channels of sarcoplasmic reticulum. Nature(Lond.) 288:595-497.

Feller, W. 1971. An introduction to probability theory and its application, Volume II. 2nd Ed. J. Wiley & Sons, New York.

FitzHugh, R. 1982. Statistical properties of the Asymmetric Random Telegraph Signal, With Applications to single-channel analysis. Math. Biosci. 64: 75-89

French, R.J. y Shoukimas, J.J. 1981. Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkilamonium ions of various sizes. Biophys. J. 34: 271-291.

French, R.J. y Shoukimas, J.J. 1985. An ion's view of the potassium channel. The Structure of the permeation pathway as sensed by a variety of blocking ions. J.Gen.Physiol. 85: 669-698.

Glasstone, S. 1947. Thermodymamics for chemists. Van Nostrand, New York.

Hille, B. 1984. Ionic Channels of excitable membranes. Sinauer associates Inc. Sunderland, Massachusets.

Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1952. A quantitative description of membrane and its application to conduction and exitation in nerve. J. Physiol. 117: 500-544.

Jordan, P.C. 1984. Effect of pore structure on energy barriers and applied voltage profiles. II. Unsymmetrical Channels. Biophys. J. 45: 1101-1107.

Latorre, R. Vergara, C. e Hidalgo, C. 1982. Reconstitution of planar lipid bilayers of a Ca^{+2}-dependent K^{+} channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79: 805-809.

Latorre, R. y Miller, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. J. Membrame Biol. 71: 11-30.

Levitt, D.G. 1978. Electrostatic calculatios for an ion channel. I. Energy and potential profiles and interaction between ions. Biophys. J. 22: 209-219.

Sigworth, F.J. 1983. Electronic design of the patch clamp. En "Single channel recording". Editores Sakmann, B y Neher, E. Plenum press, New York.

Singer, S. y Nicholson, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731

Singer, J. J. y Walsh, J. V. 1984. Large conductance calcium activated potassium channels in smooth muscle cell membrane. Reduction in unitary currents due to internal Na ions. Bioph. J. 45: 68-70.

Stanfield, P.R. 1983. Tetraethylamonium ions and the potassium permeability of exitable cells. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 79: 1-67.

Tanford, C. 1973. The hydrophobic effec : formation of micelles and biological membranes. J. Wiley & Sons, New York.

Vergara, C. 1983. Characterization of a Calcium-Activated Potasium Chanel from Skeletal Muscle membranes In artificial bilayers. Tesis. Harvard University. Boston Massachusets.

Vergara, C. y Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca activated K Channel from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. J. Gen. Physiol. 82: 543-568.

Vergara, C. Moczydlowsky, E. Latorre, R. 1984. Conduction, blockade and gating in a calcium activated K^+ channel incorporated into planar lipid bilayers. Biophys. J. 45: 73-76.

Wong, S. y Lecar, H. 1982. Single calcium-dependent potasium channels in clonal anterior pituitary cells. Biophis. J. 39: 313 - 317.

Woodhull, A.M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. J. Gen. Physiol. 61: 687-708.

Yellen, G. 1984. Ionic permeation and blockade in calcium-activated channel Cromaffin cells. Tesis. Yale University. New Haven, Conneticut.

APENDICE

Señal Filtrada

La señal filtrada estará compuesta de dos procesos, uno determinista, descrito por la ecuación del filtro y otro aleatorio, el proceso de bloqueo-desbloqueo. Para combinar ambos procesos debemos expresar (11c) en terminos probabilisticos, es decir ya no nos preguntaremos cual es la trayectoria de la curva solución de la ecuación (11c), sino con que probabilidad pasará por cierto lugar.

Caso 1 : El canal se bloquea ($x = 0 \quad \forall\ t>0$)

Definimos la función densidad de probabilidad (fdp.):

$$f_b(y)dy = \text{Prob}\{\ y \in (y\ ,\ \ y + dy)\ \} \qquad 16$$

Esto quiere decir que la probabilidad que la salida del filtro este en el intervalo (y,Y+dy) es :

$$P(\ |y-y_o|\ < \epsilon\ \ ) = \int_{y_o-\epsilon}^{y_o+\epsilon} f(u)du \qquad 17$$

Si en el instante cero la entrada del filtro se hace cero describiremos la evolución del filtro en un instante dt. Esta estará dada por 11c con $x = 0$ (queremos soluciones para $t>0$).

$$dy/dt = -y/\tau \qquad 18$$

Esto quiere decir que si en $t = 0$ la salida del filtro valia y, ahora valdrá $y - \Delta(y)$, en que

$$\Delta(y) = (y/\tau)dt \qquad 19$$

Asi si la salida del filtro está dentro del intervalo $(y+\Delta(y), y+dy+\Delta(y+dy))$ caerá dentro del intervalo $(y, y+dy)$ en un tiempo dt (fig.3).

El cambio neto de la fdp. $f_b(y)$ estar dado por la probabilidad que y caiga dentro del intervalo menos la probabilidad que salga de él.

$$Df_b(y)dy = prob\{y\in(y+dy, y+dy+\Delta(y+dy))\} - Prob\{y \in (y, y+dy)\}$$

$$Df_b(y)dy = f_b(y+dy)\Delta(y+dy) - f_b(y)\Delta(y)$$

$$Df_b(y)dy = f_b(y+dy)(y/\tau)dt + f_b(y+dy)(1/\tau)dydt - f_b(y)(y/\tau)dt$$

$$Df_b(y)dy = (y/\tau)(f_b(y+dy) - f_b(y))dt$$

$$df_b(y)/dt = d/dy(f_b(y)(y/\tau))$$

La solución de esta ecuación describe el decaimiento temporal de la fdp. de encontrar la salida del filtro en el intervalo $(y, y+dy)$ luego de que el canal se bloquea en $t = 0$.

Caso 2 : El bloqueo se libera ($x = 1 \quad \forall\ t>0$)

Por una deducción análoga a la anterior, la fdp. para el desbloqueo es solución de la siguiente ecuación :

$$df_o(y)/dt = d/dy(f_o(y)(y-1)/\tau) \qquad 21$$

Fluctuaciones.

Durante el proceso de bloqueo-desbloqueo, el canal estará fluctuando entre dos estados, abierto y bloqueado.

Si β es la probabilidad por unidad de tiempo que el canal se bloquee y α que se desbloquee, la probabilidad de encontrarlo abierto es $P_o = \alpha/(\alpha+\beta)$, y de encontrarlo bloqueado es $P_b = \beta/(\alpha+\beta)$

En esta situación el filtro se relajará hacia cero o hacia uno según el canal este abierto o bloqueado. Asi la probabilidad de que la salida del filtro esté en el intervalo $(y, y+dy)$, estará dada por la suma de dos probabilidades condicionales :

$$f(y) = P_o f_o(y) + P_b f_b(y) \qquad 22$$

en que :

$P_o f_o(y) = \text{Prob}\{\ x(t)=1\ \&\ y(t) \in (y, y+dy)/x(0)=0\ \&\ y(0)=y\ \}$

$P_b f_b(y) = \text{Prob}\{\ x(t)=0\ \&\ y(t) \in (y, y+dy)/x(0)=1\ \&\ y(0)=y\ \}$

Estas funciones de densidad satisfacen las siguientes ecuaciones (comparese con 2)(FitzHugh 1982) :

$$d/dt[P_b f_b(y)] = d/dy[P_b f_b(y)(y/\tau)] - \alpha P_b f_b(y) + \beta P_o f_o(y)$$

$$d/dt[P_o f_o(y)] = d/dy[P_o f_o(y)(y-1)/\tau] - \beta f_o(y) + \alpha P_b f_b(y)$$

Observese que en el caso extremo cuando α 0 ($P_b \rightarrow 1$) el canal no se abre, solo se bloquea, en este caso la ecuación 23a se reduce a la deducida anteriormente para un cierre. Cosa análoga sucede con 23b cuando β 0 ($P_o \rightarrow 1$).

Estas ecuaciones se pueden resolver en estado estable (haciendo cero el término de la derecha). Usando el hecho que las soluciones se anulan fuera del intervalo (0,1) y su integral vale 1 por ser densidades de probabilidad, se

demuestra que :

$$f_a(y) = y^{a-1}(1-y)^b/B(a,b-1) \qquad 24a$$

$$f_b(y) = y^a(1-y)^{b-1}/B(a-1,b) \qquad 24b$$

En que B(a,b) es la funcion Beta definida por :

$$B(m,n) = \int_0^1 s^{m-1}(1-s)^{n-1}ds \qquad 25$$

Asi la fdp buscada es :

$$f(y) = y^{a-1}(1-y)^{b-1}/B(a,b) \qquad a=\alpha\tau \qquad 26$$

$$b=\beta\tau$$

En lo sucesivo se hará referencia a f como distribución Beta (vease fig. 4).