

HAG-B
L384
c.1

ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH EN LA ACTIVACION DEL CANAL
DE POTASIO DEPENDIENTE DE CALCIO, INCORPORADO EN
BICAPAS ARTIFICIALES DE FOSFOLIPIDOS.

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

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Claudio A. Laurido Fuenzalida

Noviembre de 1989



Profesores guía: Dr. Daniel Wolff
Dr. Ramón Latorre.

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

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

Claudio Aurelio Laurido Fuenzalida

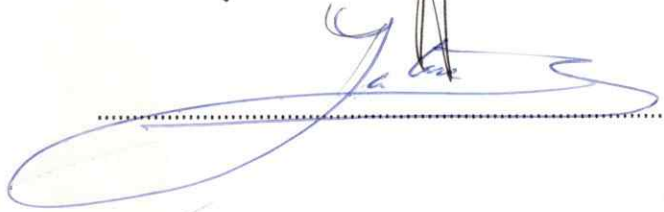
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de defensa de Tesis rendido en Enero de 1990.

Patrocinantes de Tesis:

Dr. Daniel Wolff



Dr. Ramón Latorre

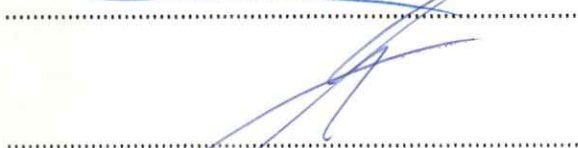


Comisión Informante de Tesis:

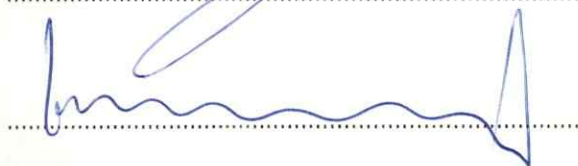
Dr. Mario Luxoro



Dr. Osvaldo Alvarez



Dr. Ricardo Bull



A Macarena y frutos (Macarena y Valentina)

A mis padres



AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo agradecer muy sinceramente a todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología por haberme acogido y brindado la oportunidad de adquirir valiosas enseñanzas que han hecho posible que este trabajo haya podido llegar a término. Sin embargo, quisiera agradecer muy especialmente a mis tutores Dr. Daniel Wolff y Dr. Ramón Latorre por su constante apoyo y valiosas discusiones de mi trabajo de Tesis; al Dr. Osvaldo Alvarez por la paciencia, dedicación y tiempo que me concedió para solucionar las muchas dudas que tuve en la resolución de los aspectos cuantitativos de mi Tesis; a Ximena Cecchi, Carmen Alcayaga, Victoria Gaete, David Naranjo, Ricardo Delgado, Andrés Oberhauser, Marco A. Díaz, Nataniel Malebrán por la oportunidad de disfrutar y compartir su amistad en los buenos y malos momentos; a Anita Godoy, Juan Valencia y Juan Espinoza por el cariño y preocupación que me brindaron en todo momento.

Agradezco a la Universidad de Santiago el apoyo financiero que hizo posible mi estadía en el Programa de Magister de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.



INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCION	1
-Generalidades	1
-Reconstitución de canales en bicapas de fosfolípidos	1
-Canal de K^+ activado por Ca^{+2} de alta conductancia	2
-Efecto del pH en canales iónicos	2
-Objetivos	6
MATERIALES Y METODOS	7
-Preparación de vesículas de membrana de túbulo transverso de músculo esquelético de rata.	7
-Formación de bicapas planas de fosfolípidos e incorporación de canales.	8
-Equipo eléctrico	9
-Generador de pulsos	9
-Convertor corriente-voltaje	12
-Amplificador de ganancia variable	12
-Filtro activo	12
-Sistema de adquisición de datos	13
-Soluciones usadas	13
-Protocolo experimental	13

-Determinación de los parámetros cinéticos	15
RESULTADOS	17
-Efectos del calcio, potencial y pH sobre la actividad del canal	17
-Efecto del pH en la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto	17
-Efecto del pH en las curvas de activación del canal	17
-Efecto del pH en los tiempos promedio abierto y cerrado del canal	19
-Planteamiento del modelo	25
-Experimentos realizados a potencial constante, pH y calcio variables	27
DISCUSION	40
-Comparación del efecto del pH en canales de potasio activados por calcio registrados de membranas nativas por la técnica de "patch-clamp" e incorporados en bicapas planas	40
-La sensibilidad al calcio es diferente para cada canal	41
-Los experimentos deben realizarse en la presencia de canal único	41
-El comportamiento cinético del canal no es constante en el tiempo	42
-Los cambios de pH no pueden ser menores que una unidad de pH	42
-Hacia un entendimiento molecular del efecto del pH	43
-Conclusión final	48
BIBLIOGRAFIA	54
APENDICE I	56
APENDICE II	56
APENDICE III	65

LISTA DE TABLAS

TABLA I.- Valores de V_0 y n para diferentes experimentos realizados con canal único en función del potencial a diferentes pH y concentraciones de calcio	20
TABLA II.- Valores de las constantes de disociación de calcio y de las transiciones abierto-cerrado del canal	30
TABLA III.- Constantes de disociación dependientes del pH	37
TABLA IV.- Efecto del pH en los valores de V_0 obtenidos en canales únicos mediante el uso de la técnica de "patch-clamp"	40
TABLA V.- Valores de L_{obs} para el estado abierto y cerrado del canal y sus valores corregidos, a dos pH	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cámara de formación de bicapas	10
Figura 2.	Diagrama esquemático del sistema de medición y adquisición de datos	11
Figura 3.	Registros de corriente de canal único a potencial y calcio constante a diferentes pH	18
Figura 4.	Efecto del pH en las curvas de activación del canal, en función del potencial	21
Figura 5.	Histogramas de duraciones de canal único a calcio constante y dos pH	23
Figura 6.	Efecto del pH en los tiempos promedio abierto y cerrado versus el potencial	24
Figura 7.	Efecto del pH en los tiempos promedio cerrado versus $1/[Ca]$, sin corregir por eventos perdidos	28
Figura 8.	Efecto del pH en el gráfico de Hill	29
Figura 9.	Efecto del pH en los tiempos promedio abierto del canal a potencial constante	32
Figura 10.	Efecto del pH en los tiempos promedio cerrado del canal a potencial constante	33
Figura 11.	Aplicación del modelo al estado abierto del canal	38
Figura 12.	Aplicación del modelo al estado cerrado del canal	39

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

α, α'	: Constantes cinéticas de la reacción de cierre del canal.
β, β'	: Constantes cinéticas de la reacción de apertura del canal.
$^{\circ}\text{C}$: Grados Celcius.
"cis"	: Compartimiento en el cual se agregan las vesículas de membrana.
FM	: Frecuencia modulada.
g	: Constante de aceleración de gravedad.
I_o	: Corriente que circula a través de la bicapa de fosfolípidos.
$k_{1,4}$: Constantes cinéticas de pseudo primer orden de unión de calcio.
$K_{1,2,4}, K'_{1,2}$: Constantes de disociación de unión de calcio.
$^{\circ}\text{K}$: Grados Kelvin.
$K_{\text{exp}}(\text{pH})$: Constantes de disociación de unión de calcio en función del pH.
$K_{\text{H}}, K'_{\text{H}}$: Constantes de disociación de unión de protones.
kHz	: Kilo Hertzio.
MOPS	: Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.
n	: Valencia efectiva. Producto de la carga (z) por la distancia fraccional del campo eléctrico (δ).
n_{H}	: Número de Hill.
nm	: Nanometro (10^{-9} metros).
P_o	: Probabilidad de encontrar un canal en el estado abierto.
pdf	: Función de densidad de probabilidad.
PE	: Fosfatidiletanolamina.
pF	: Picofaradio (10^{-12} Faradios).
pK_{H}	: Antilogaritmo de la constante de disociación de unión de protones.

- p/v : Peso / volumen.
- R : Constante de los gases.
- R_e : Resistencia de entrada.
- R_r : Resistencia de retroalimentación.
- T_a : Tiempo promedio abierto.
- T_c : Tiempo promedio cerrado.
- "trans" : Compartimiento que está sometido a tierra virtual.
- TRIS : Tris (Hidroximetil) amino-metano.
- TRIS-maleato, pH_x
: Solución de TRIS a la cual se le agrega ácido málico hasta pH_x .
- V_o : Voltaje en el cual $P_o = 0,5$.
- Voltage-clamp
: Configuración de un sistema que permite controlar el potencial de membrana de una célula o preparación.
- V_s : Voltaje de salida.

RESUMEN

Esta Tesis presenta el efecto del pH en canales de potasio activados por calcio de membranas de músculo esquelético de rata, incorporados en bicapas artificiales de fosfolípidos.

En experimentos realizados a potencial constante (+30 mV) en los cuales se varió la concentración de calcio y el pH, se pudo observar lo siguiente:

a) Los cambios de pH modifican la cinética del canal sólo si estos se realizan en el lado sensible al calcio (intracelular).

b) La acidificación a una concentración de calcio constante, induce una disminución de la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto (P_o) a un potencial dado.

c) El tiempo promedio en el estado abierto del canal (T_a), es una función lineal de $[Ca^{2+}]$ y el tiempo promedio en el estado cerrado (T_c), es una función lineal de $1/[Ca^{2+}]^2$.

d) Las curvas de T_a versus $[Ca^{2+}]$ y T_c versus $1/[Ca^{2+}]^2$ muestran que al acidificar se produce una disminución de T_a y un aumento de T_c . El pH cambia las pendientes, pero no los interceptos de las curvas de T_a versus $[Ca^{2+}]$ y T_c versus $1/[Ca^{2+}]^2$.

A partir de estas observaciones se planteó un modelo cinético compatible con los efectos observados al variar el pH. Este modelo supone la existencia de uno o más sitios en la proteína-canal que al protonarse inducirían una reducción en la afinidad del calcio por los sitios de ligamen de calcio del canal. Esta reducción en la afinidad del calcio se produciría de manera independiente del estado conformacional (abierto/cerrado) del canal. El valor de pK_H que se obtuvo para el sitio fue de 6,6 para ambos estados del canal.

ABSTRACT

We have studied the effect of pH on the activation of the K(Ca) channel isolated from rat skeletal muscle incorporated into planar lipid bilayers. Experiments were done at a constant applied voltage of +30 mV and at different intracellular calcium concentrations and pH's.

a) At constant $[Ca^{2+}]$, changes in pH modified channel kinetics only from the calcium sensitive face of the channel (intracellular).

b) At constant $[Ca^{2+}]$, intracellular acidification induced a decrease in the open probability (P_o) of the channel.

c) The mean open time (T_o) of the channel was a linear function of $[Ca^{2+}]$ and the mean closed time (T_c) was a linear function of $1/[Ca^{2+}]^2$.

d) A decrease in the intracellular pH induced a decrease in T_o and an increase in T_c . Changes in the internal $[H^+]$ modified the slope, but not the intercept of the relations T_o versus $[Ca^{2+}]$ and T_c versus $1/[Ca^{2+}]^2$.

On the basis of these results we proposed a kinetic model of the effect of pH on this channel. This model relates the lowering of the calcium affinity of the channel with the presence of an titratable site(s) in the channel whose pK_H was 6.6 for both open and closed states of the channel.

INTRODUCCION

A.- GENERALIDADES

Todas las células vivientes poseen una membrana que separa los medios intra y extracelulares. Los diversos modelos que existen describen a esta membrana como formada por una delgada bicapa de fosfolípidos (4-10 nm) que presenta una alta resistencia al flujo de iones. De acuerdo al modelo propuesto por Singer y Nichols, 1972, las proteínas de membrana se pueden clasificar en extrínsecas e intrínsecas, dependiendo de el grado de interacción que presenten con la bicapa de fosfolípidos. Aquellas llamadas extrínsecas están asociadas con una sola monocapa de fosfolípidos, en cambio las intrínsecas atraviesan la membrana de lado a lado, interactuando con ambas monocapas. La presencia en la bicapa de un cierto tipo de proteínas integrales de membrana -los canales iónicos- cataliza los procesos de transferencia de iones entre los medios intra y extracelulares. Muchos procesos celulares tales como la conducción de los impulsos nerviosos, la contracción muscular, la secreción hormonal, etc. dependen de estos flujos pasivos de iones. Este es posible gracias a la presencia en las proteínas que forman un canal iónico de un poro que comunica a ambos medios y que permite el movimiento de agua y iones en su interior. Este flujo de iones puede ser medido mediante el uso de técnicas electrofisiológicas.

B.- Reconstitución de canales en bicapas de fosfolípidos.

La reconstitución de funciones de transporte a través de membranas requiere de la presencia de dos sistemas acuosos que imiten a los medios intra y extracelulares. Para satisfacer este requisito se han desarrollado varias técnicas. Una de ellas consiste en el

aislamiento de vesículas de membrana para posteriormente fusionarlas en una bicapa artificial de fosfolípidos formada entre dos compartimientos acuosos. (Miller y Racker, 1976 ; Miller, 1983). De esta manera, la incorporación de canales a la bicapa se detecta por la aparición de una corriente que fluctúa en valores discretos al aplicar una diferencia de potencial. Dichas fluctuaciones se asocian a estados conductores y no conductores del canal. La presencia de múltiplos de esta corriente indican el número de canales presentes en la bicapa de fosfolípidos.

C.-Canal de potasio activado por calcio.

Este canal ha sido descrito y caracterizado en numerosas preparaciones: células cromafines de bovino (Marty, 1981), miotúbulos de rata (Pallota y col., 1981; Methfessel y Boehm, 1982), células de la pituitaria anterior (Wong y col.,1982), neuronas de vertebrados (Adams y col., 1982), músculo esquelético de rata (Moczydlowski y Latorre, 1983a; Villarroel y col., 1988), músculo esquelético de conejo (Latorre y col.,1982), membranas de músculo liso de intestino de conejo (Cecchi y col., 1986). Entre sus propiedades figura la de ser altamente selectivo al ion potasio y presentar además una alta conductancia a ese ion. Su actividad puede ser regulada por dos mecanismos distintos; tanto el Ca^{+2} intracelular como la diferencia de potencial a través de la membrana activan este canal aumentando la probabilidad de residencia en su estado conductor (abierto).

D.- Efecto del pH en canales iónicos.

Existen una serie de procesos fisiológicos en los que el pH actúa como un factor modulador del flujo de iones a través de la membrana en sistemas transportadores, bombas iónicas y

canales. Los cambios de pH pueden provocar alteraciones importantes en el grado de ionización de los grupos químicos involucrados en los sitios de unión de los iones que son transportados en la vía de conducción o de los que modulan la actividad del canal. En particular, los protones pueden unirse a los sitios de ligamen de agonistas de un canal y con ello modificar sus propiedades de permeabilidad iónica.

Los efectos de los cambios de pH sobre los canales iónicos pueden alterar el mecanismo de conducción de iones (Hille, 1968 ; Begenisich y Danko, 1983) o la cinética de apertura y cierre del canal. Con respecto a esto último se han realizado estudios en canales de sodio en fibras de músculos semitendinosos de sapo (Nonner y col., 1980). Este trabajo apunta al estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de inactivación de los canales de sodio durante el desarrollo de un potencial de acción. En el proceso de excitación de un nervio o un músculo se produce una apertura y cierre ordenada de canales en la membrana celular. Así, durante el potencial de acción, los canales de sodio se abren (proceso de activación) a medida que avanza la onda de despolarización a lo largo del nervio o músculo produciendo una entrada de sodio para luego cerrarse (proceso de inactivación). Se han descrito muchos agentes químicos que aplicados extracelularmente, disminuyen o eliminan el proceso de inactivación de los canales de sodio. Entre los compuestos con acción inactivadora se encuentran la N-Bromoacetamida (NBA), formaldehído, glutaraldehído, etc. Sin embargo, Nonner y col. encontraron que simplemente bajando el pH intracelular del axón perfundiendo el axón con una solución tampón de histidina a pH 5,0 se producía un efecto inhibitorio similar. Se puede concluir entonces que tanto los agentes químicos inhibitorios como los protones actúan de forma sinérgica en el proceso de inactivación de los canales de sodio.

Los canales de cloruro extraídos del órgano eléctrico de Torpedo californica. (Hanke y Miller, 1983) presentan tres estados de conductancia: uno cerrado y dos abiertos. Los autores

postulan que se trataría de un canal compuesto de dos "protocanales" en paralelo que fluctúan en forma independiente en una escala de tiempo de milisegundos, pero acoplados en una escala de tiempo de segundos. Los resultados indican que la probabilidad de encontrar un protocanal activo aumenta en función del potencial y que éste es fuertemente activado a medida que se disminuye el pH en el lado intracelular. La dependencia del canal con respecto al potencial y el pH dio origen a un modelo cinético de cuatro estados en el cual los dos estados abiertos y los dos cerrados pueden ser protonados en un residuo que cambia su pK desde 6 a 9 al abrirse el canal. Aun cuando los autores no pudieron identificar el o los grupos químicos involucrados en los cambios de pK, de acuerdo a precedentes bioquímicos ellos estimaron que el aminoácido lisina con un pK = 9,2 en el estado abierto pudo ser perturbado a un pK = 6 por la proximidad de un residuo cargado positivamente en la conformación cerrada del canal. Alternativamente, el aminoácido histidina (pK=6,8) en el estado cerrado pudo haber incrementado su pK a 9 al moverse cerca de un grupo cargado negativamente en el estado abierto. Lo anterior supone la ocurrencia de un cambio conformacional de la proteína acoplado a un cambio en la constante de disociación del o los grupos titulables de la proteína. El cambio conformacional producido aproximaría el grupo tituable a otro residuo cargado produciendo el cambio en el pK observado. Este fenómeno no es raro en la literatura bioquímica, un ejemplo clásico lo constituye el efecto Bohr en la hemoglobina (Kilmartin y Rossi-Bernardi, 1973) en el cual un grupo histidina de la hemoglobina incrementa su pK una unidad al producirse la desoxigenación.

Se han realizado además, estudios acerca del efecto del pH en canales de potasio. Estos incluyen un canal de potasio dependiente de calcio (maxi canal) presente en la membrana ventricular del epitelio del plexo coroideo de anfibio (Christensen y Zeuthen, 1987) y en células β del páncreas de rata (Cook y col., 1984). Ambos fueron registrados usando la técnica de "Patch-clamp" (Hamill y col., 1981).

El efecto del pH en estos canales se manifiesta en un desplazamiento de las curvas de activación del canal hacia potenciales más despolarizantes a medida que se acidifica el lado citoplasmático de la membrana celular. Para comparar la sensibilidad del canal a diferentes pH se determinó el potencial requerido para activar el canal en un 50 % de su actividad máxima (V_0). De esta manera, Christensen y Zeuthen reportan un cambio en V_0 de alrededor de 30 mV al cambiar el pH de 7,4 a 6,4. La sensibilidad al pH encontrada por estos autores es similar a la encontrada por Cook y col. Así, en células β el cambio de pH desde 7,6 a 7,2 el valor de V_0 se incrementa en alrededor de 14 mV ;el cambio de pH desde 7,2 a 6,8 el valor de V_0 aumenta en 25 mV. Lo anterior estaría indicando que la afinidad del canal por los protones pareciera estar en un $pK_H \approx 7$. Una dependencia similar con respecto al pH ha sido descrita en canales de potasio de alta conductancia de retículo sarcoplásmico (Labarca y col., 1980).

La influencia del pH fue interpretada como un efecto de competencia entre el calcio y los protones por el o los sitios de unión a la proteína-canal. Esto es fundamentado por Cook y col. en el sentido de que la sensibilidad del canal a un cambio en la concentración de calcio intracelular es contrarrestado por un cambio similar en la concentración de protones. Christensen y Zeuthen discuten que el canal presenta estados protonados al acidificar y que estos determinarían una mayor residencia del canal en el estado protonado impidiendo al canal abrirse. Dicho de otro modo, la unión de los protones a los sitios de unión de calcio tendrían un efecto antagonista al del calcio.

En resumen, el efecto del pH en los distintos tipos de canales discutidos implica la interacción de los protones con grupos químicos presentes en el lado intracelular de los canales. Estas interacciones se producirían directamente en grupos responsables de la unión de calcio a la proteína-canal generando fenómenos de competencia de los protones por esos sitios, o en sitios alostéricos ionizables que modificarían la afinidad de la molécula agonista por sus sitios de ligamen. En ambos casos, se producirían ya sea cambios conformacionales de la

proteína-canal o cambios en el pK de residuos de aminoácidos que serían responsables de los efectos del pH antedichos.

E.- OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares que participan en la modulación del transporte de iones en el canal de potasio activado por calcio. Estos mecanismos involucran la interacción, entre otros, del canal con agonistas o antagonistas de los sitios de unión del calcio, con sitios alostéricos y la presencia de sitios ionizables dentro del sistema de conducción iónica del canal.

Los objetivos específicos de la presente Tesis son los siguientes:

a) Estudio del efecto del pH en la activación del canal de potasio modulado por calcio, incorporado en membranas planas de fosfolípidos y

b) Elaborar un modelo cinético que permita explicar los desplazamientos de las curvas de probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto versus el potencial, en función del pH y concentración de calcio, suponiendo una interacción con uno o más sitios que disminuirían la afinidad del calcio por los sitios de ligamen de calcio del canal.

MATERIALES Y METODOS

A.- Preparación de vesículas de membrana de túbulo transverso de músculo esquelético de rata.

El método de formación de vesículas se basa en una simplificación (Moczydlowski y Latorre 1983b) del método originalmente descrito por Roseblatt y col. (1981). Brevemente, el procedimiento consiste en la obtención de una fracción microsomal de membrana de túbulo transverso de músculo de rata por homogeneización y centrifugación diferencial. Este consta de las siguientes etapas:

- a) Alrededor de 200 g de músculo esquelético se homogeneizan en una juguera combinado con cuatro volúmenes de una solución que contiene KCl 100 mM, TRIS-maleato 20 mM a pH 7.
- b) Se colecta el sobrenadante producido después de una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos y se agregan cristales de KCl hasta obtener una concentración final de 600 mM, con el propósito de solubilizar las proteínas contráctiles.
- c) Luego se centrifuga el sobrenadante a 80.000 x g durante 60 minutos.
- d) El sedimento obtenido se resuspende en 30 ml de sacarosa 250 mM, TRIS-maleato 20 mM a pH 7.
- e) Centrifugación a 10.000 x g durante 60 minutos para precipitar las mitocondrias remanentes:
- f) El sobrenadante se centrifuga en una gradiente discontinua de sacarosa (25, 27,5 y 32,5 %(p/v)).
- g) Se colectan las fracciones que sedimentaron entre las capas 25 y 27,5 %.
- h) Centrifugación a 80.000 x g durante 60 minutos en TRIS-maleato 20 mM a pH 7.
- i) El sedimento se resuspende en un volumen total de 2 ml conteniendo 300 mM de sacarosa, TRIS-maleato a pH 7.

j) Se divide en pequeñas fracciones, se congelan en una mezcla frigorífica de hielo seco-acetona y se guardan en refrigerador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas fracciones constituyen la preparación a usar en los experimentos. Todo el proceso se realiza en una cámara fría ($0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

B.- Formación de bicapas planas de fosfolípidos e incorporación de canales.

Las bicapas se formaron de acuerdo a la técnica descrita por Müller y col. (1963) en un agujero de $300\text{ }\mu\text{m}$ practicado en una película de Teflón que separa dos compartimientos (figura 1) que contenían una solución de KCl 300 mM, MOPS-K 20 mM a pH 7,0. Los lípidos consistían en una solución de fosfatidiletanolamina de cerebro (Avanti Polar lipids) disueltos en decano ($12,5\text{ mg/ml}$).

La formación de las bicapas se puede visualizar midiendo su capacidad eléctrica. Esta es proporcional al área de la bicapa (Álvarez y Latorre, 1978). Al aplicar un pulso rectangular de voltaje se produce una corriente capacitiva en los puntos en que la variación de potencial es máxima. La integral de esta corriente es proporcional al cambio de voltaje y a la capacidad y por lo tanto al área de la membrana. El sistema se calibra previamente con un condensador de 300 pF de manera de obtener un valor de 100 pF/Volt.

La resistencia de la bicapa se calculó midiendo la corriente que circula al aplicar un pulso de potencial constante de + 40 mV.

Membranas con valores de 150-300 pF de capacidad y resistencias $\geq 50 \times 10^9$ Ohms fueron utilizadas en los experimentos.

Las vesículas de membrana se agregan al lado "cis" (intracelular) bajo agitación a una concentración final de proteínas de alrededor de $5\text{ }\mu\text{g/ml}$. La incorporación de canales se detectaba como la aparición de fluctuaciones discretas de la corriente al aplicar una diferencia de potencial eléctrico a través de la bicapa. Esta se mide con un sistema de control de potencial

de dos electrodos (Alvarez, 1986). El lado "cis" se conecta a un generador de funciones y el lado "trans" (extracelular) a un conversor corriente-voltaje a través de electrodos idénticos de Ag/AgCl mediante puentes salinos de agar KCl 1 M.

Los cambios de las soluciones de la cámara se realizaron perfundiendo el lado "cis" de la cámara con un sistema de jeringas que permiten mantener constante el nivel de líquido en la cámara. Los cambios de pH se realizaron perfundiendo la cámara con soluciones de pH determinados.

C.- Equipo eléctrico.

El equipo eléctrico usado consiste en una cámara de formación de la bicapa con electrodos asociados, conectada a diferentes unidades. Un esquema simplificado se muestra en la figura

2. Sus partes componentes son las siguientes:

c.1.- Generador de pulsos.

Este tiene dos modalidades de funcionamiento:

a) Posee un generador de ondas rectangulares de voltaje, usado para determinar la capacidad eléctrica de la bicapa de fosfolípidos.

b) Genera pulsos constantes de potencial entre +100 y -100 mV. Esto permite establecer diferencias de potencial de valores discretos a través de la bicapa.

**TRANSDUCTOR
CORRIENTE - VOLTAJE**

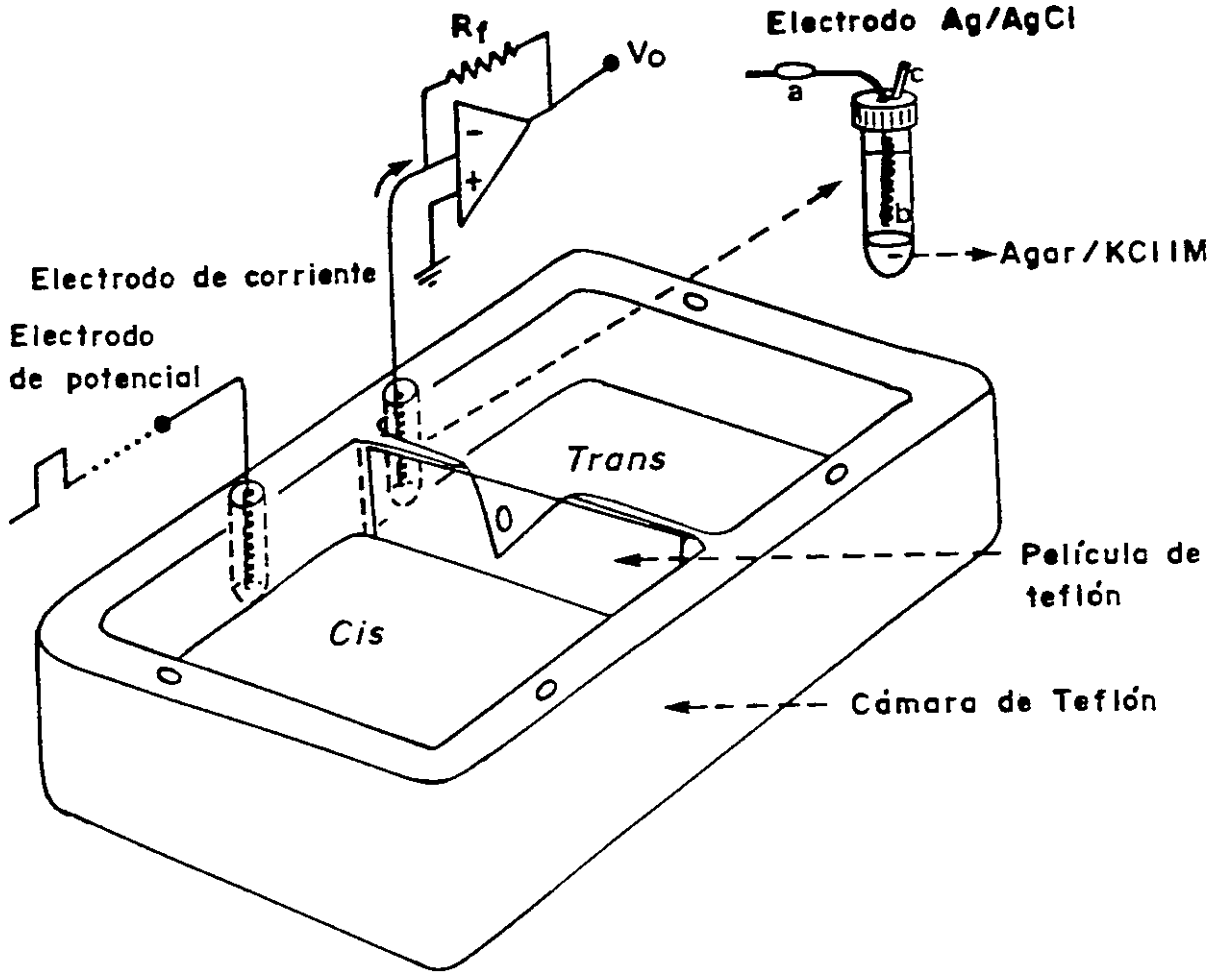


FIGURA 1

La cámara de formación de bicapas está formada por un bloque de Teflon que posee dos compartimientos de 3 ml cada uno separados por un tabique. Se define el compartimiento "cis" al que posee el generador de funciones y "trans" al del conversor corriente-voltaje. Ambos se conectan a la cámara mediante electrodos idénticos de Ag/AgCl. El tabique tiene adosado y mantenido con una delgada capa de grasa de silicona en una de sus caras, una película de Teflon con un orificio en el cual se forma la bicapa de fosfolípidos. Los restantes orificios se usan para perfundir las diferentes soluciones.

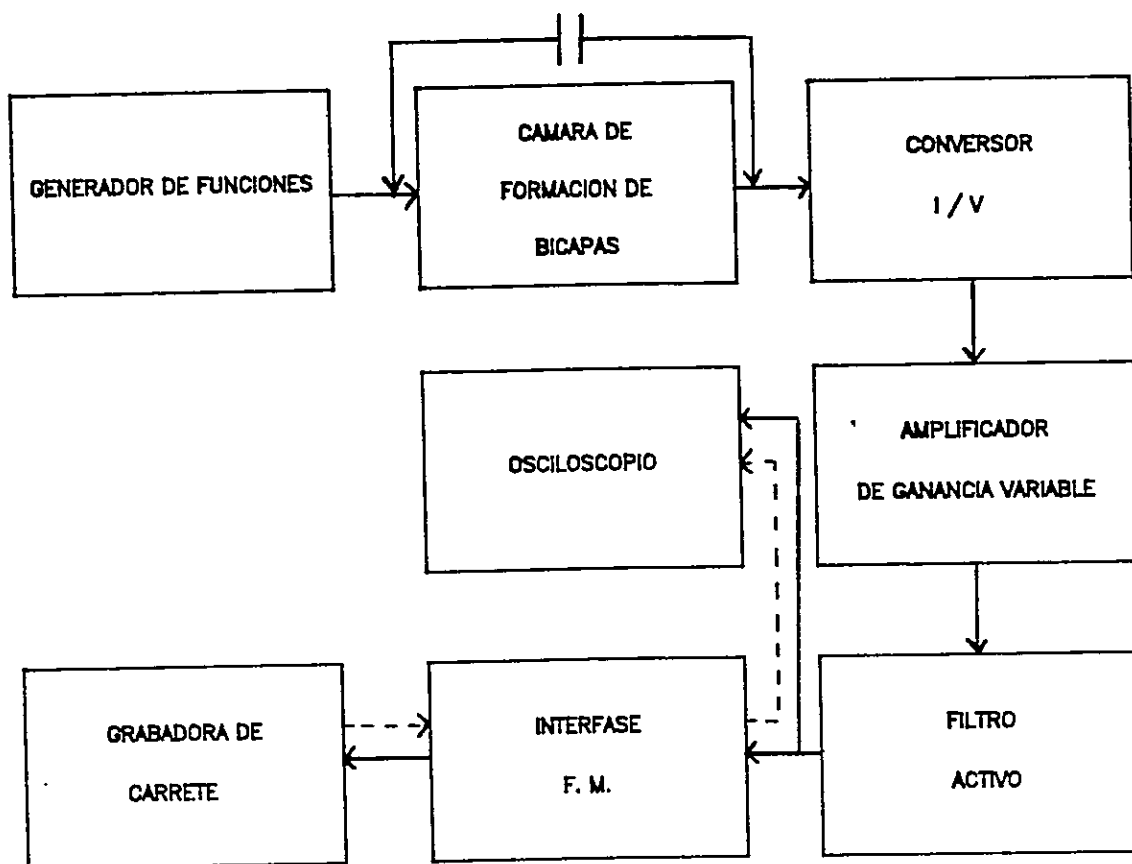


FIGURA 2

Diagrama esquemático del sistema de medición y adquisición de datos.

La figura muestra un diagrama en bloques del sistema de medición y adquisición de datos. Al posicionar el generador de funciones en el modo de pulsos rectangulares de voltaje, se puede calibrar el valor de la capacidad eléctrica que presentará la bicapa de fosfolípidos por medio del condensador de 300 pF tal como se describe en la parte B de Métodos. Luego se procede a reinstalar la cámara y formar una bicapa de acuerdo a la calibración realizada. Una vez obtenida la bicapa e incorporado una canal, los registros de corriente se visualizan en el osciloscopio y se guardan en la grabadora de carrete.

La línea punteada representa el modo de observación de los registros previamente grabados.

La cámara de formación de bicapas y el convertor I/V se encuentran aislados mecánica y eléctricamente. Lo primero se logra colocando ambos sobre un sistema de amortiguación compuesto de un bloque de hierro de gran peso, montado sobre un neumático y colocado dentro de una caja de paredes gruesas. Lo segundo mediante el uso de blindajes tanto en el convertor como en la cámara (pantalla de Faraday).

c.2.- Conversor Corriente-voltaje.

Este circuito se construye con un amplificador operacional configurado en el modo de retroalimentación negativa por medio de una resistencia de 10^9 Ohms. De esta manera, virtualmente toda la corriente circula por la resistencia de retroalimentación, dejando el potencial de la entrada del amplificador en cero virtual. El potencial a la salida del amplificador es entonces igual a $V_s = -I_0 \times R_f$. En que I_0 es la corriente que circula a través de la bicapa y R_f , la resistencia de retroalimentación.

c.3.- Amplificador de ganancia variable.

Está constituido por un amplificador operacional, una resistencia de entrada y resistencias de retroalimentación. La amplificación se obtiene de la relación entre la resistencia de entrada y la de retroalimentación, de acuerdo a lo siguiente:

$$V_s = -V_e R_f / R_e$$

V_e , es el potencial de entrada; R_e es la resistencia de entrada. Modificando R_f se obtienen diferentes ganancias. En este caso particular se diseñó el amplificador con valores de 10X, 20X y 50X. Incorporado a este equipo está un amplificador sumador de ganancia uno. Este adiciona a la señal de salida un potencial constante que sirve para modificar la línea base de los registros de corriente.

c.4.- Filtro activo.

Este elemento se usa debido a que concomitante con una gran amplificación está la presencia de ruido eléctrico. El filtro activo es un sistema pasa bajos cuya frecuencia de corte puede ajustarse a voluntad. Esto mejora la relación señal/ruido. En todos los experimentos se usó 1 kHz.

c.5.- Sistema de adquisición de datos.

Este consiste de una interfase FM que permite la grabación de los registros de corriente ionica en una cinta de audio.

D.- Soluciones usadas.

- i) KCl 300 mM, MOPS-K 20 mM ajustado a diferentes pH.
- ii) KOH 1 M
- iii) HCl 1 M
- iv) CaCl_2 30 mM
- v) CaCl_2 300 mM

Las soluciones de KCl y MOPS-K fueron preparadas semanalmente a partir de soluciones "stock" de 2 M y 200 mM respectivamente. Estas soluciones se guardaron a -18°C . El pH de las soluciones fue revisado al comienzo de cada experimento siendo aceptable un error de $\pm 0,1$ unidades de pH. Todos los reactivos usados fueron Merck grado pro análisis.

E.- Protocolo experimental.

Todos los experimentos se realizaron en la presencia de canal único incorporado en la bicapa. El protocolo incluyó dos tipos de experimentos:

a) Experimentos a potencial, calcio y pH variable.

En esta modalidad, las condiciones iniciales de trabajo eran KCl 300 mM simétrico, $[Ca^{+2}] = 30 \mu M$ y pH 7,0/7,0 cis/trans.

Una vez verificada la presencia de canal único se procedía a modificar el potencial a través de la bicapa en intervalos de 10 mV, registrando las fluctuaciones de la corriente en cada caso. Cada registro de corriente tenía una duración de alrededor de 60 segundos, período en que se producían entre 500 a 2000 transiciones abierto-cerrado del canal. A continuación se adicionaba calcio (100 ó 300 μM) al lado cis y se procedía a repetir el protocolo de potenciales para cada concentración de calcio usada.

Luego se procedía a perfundir el lado cis de la cámara con la solución de KCl 300 mM, $[Ca^{+2}] = 30 \mu M$, a un pH diferente, repitiéndose todos los pasos anteriormente descritos.

b) Experimentos a potencial constante, calcio y pH variables.

En estos experimentos, la incorporación de canal único se realizaba en una solución simétrica de KCl 300 mM, $[Ca^{+2}] = 100 \mu M$ cis y contaminante en el lado trans a pH 7,0, manteniendo aplicado un potencial de +30 mV, con el propósito de visualizar la incorporación del canal. A continuación se perfundía la cámara con una solución que contenía calcio contaminante ($\approx 5 \mu M$) procediéndose a realizar registros de corriente en cada adición

sucesiva de calcio, en intervalos de $20 \mu\text{M}$ cada uno, hasta $100 \mu\text{M}$. Luego se perfundía nuevamente la cámara con una solución a diferente pH repitiéndose las adiciones anteriores de calcio.

En ambos protocolos antes descritos, debido a las perturbaciones de perfusión, adición y agitación a que era sometida la bicapa, se producía con mucha frecuencia la ruptura de ella antes de que se completara el protocolo experimental. Esto marcaba el fin del experimento, ya que estos no son adicionables. Lo anterior es debido a que cada canal posee una diferente sensibilidad al calcio y $P_0(V)$, o sea, la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto, en función del voltaje. Estos experimentos incompletos se usaron solamente como referencias cualitativas de los efectos del calcio y pH. Los análisis cuantitativos se realizaron en experimentos completos.

F.-Determinación de los parámetros cinéticos.

Los registros de corriente de canal único previamente grabados analógicamente en cinta de audio fueron digitalizados y transferidos a la memoria de un computador. Los estados abierto y cerrado se identificaron colocando un discriminador en un punto situado en el 50 % del valor de la corriente del estado abierto. A continuación se construyó una lista de duraciones en los estados abierto (sobre el umbral) y cerrado (bajo el umbral). Esta lista de tiempos se corrigió tomando en cuenta el tiempo muerto del sistema de registro, de acuerdo al método descrito por Colquhoun y Sigworth (1983).

Los eventos cinéticos del canal que involucran aperturas y cierres de corta vida fueron limitados a tiempos de apertura iguales o mayores que 1 ms. Entonces aquellos que tenían una duración menor que 1 ms eran incluidos como parte del estado precedente.

El comportamiento cinético de este canal no es constante. La probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto sufre variaciones importantes en el tiempo. Estas pueden ser reversibles o irreversibles durante el transcurso de un experimento. Dado que este fenómeno no ha sido completamente entendido hasta el momento, solo aquellos registros que muestran una constancia en P_o fueron considerados. Para ello, los registros de corriente (alrededor de 60 segundos de duración) fueron divididos en segmentos de alrededor de 10-20 segundos procediéndose a calcular los valores de P_o de cada uno de ellos. Si los valores obtenidos se alejaban más de un 10% con respecto al valor de P_o del registro largo, todo el registro era descartado.

El canal posee además en su comportamiento cinético estados cerrados con duraciones del orden de segundos. Estos estados cerrados han sido descritos sobre la base de un bloqueo dependiente del potencial producido por el calcio (Vergara y Latorre, 1983). Por ello, transiciones abierto-cerrado con duraciones mayores que 500 ms fueron excluidas de los análisis de tiempos de permanencia. Con estos tiempos corregidos, se construyeron histogramas de duraciones (Sigworth y Sine 1987). Los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud y fueron corregidos tomando en cuenta que los eventos menores que 1 ms han sido eliminados, tal como lo describen Blatz y Magebly (1986).

RESULTADOS

A.- Efectos del calcio, potencial y pH sobre la actividad del canal.

a.1.- Efecto del pH en la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto.

La figura 3 presenta registros de corriente de canal único en los cuales se muestra el efecto producido al acidificar el lado cis o intracelular del canal, bajo condiciones de calcio constante a un potencial aplicado de +30 mV. Se puede observar que a medida que la concentración de protones se incrementa, la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto disminuye. Esto sugiere que al acidificar se interfiere de alguna manera con la afinidad del calcio en los sitios de ligamen de calcio de la proteína-canal. Este efecto no se observa si se modifica la concentración de protones en el lado trans o extracelular. (resultados no mostrados).

a.2.- Efecto del pH en las curvas de activación del canal.

Se ha descrito que para este canal la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto (P_o) versus el potencial, es una función sigmoidea de P_o (Ver Apéndice I). Por otro lado, si aumentamos la concentración de calcio, las curvas de P_o versus el potencial, se desplazan hacia la izquierda (Latorre y col., 1982 ; Methfessel y Boheim, 1982 ; Wong y col., 1982). La figura 4 muestra un ejemplo de las curvas de activación del canal en función del pH, a dos concentraciones de calcio.

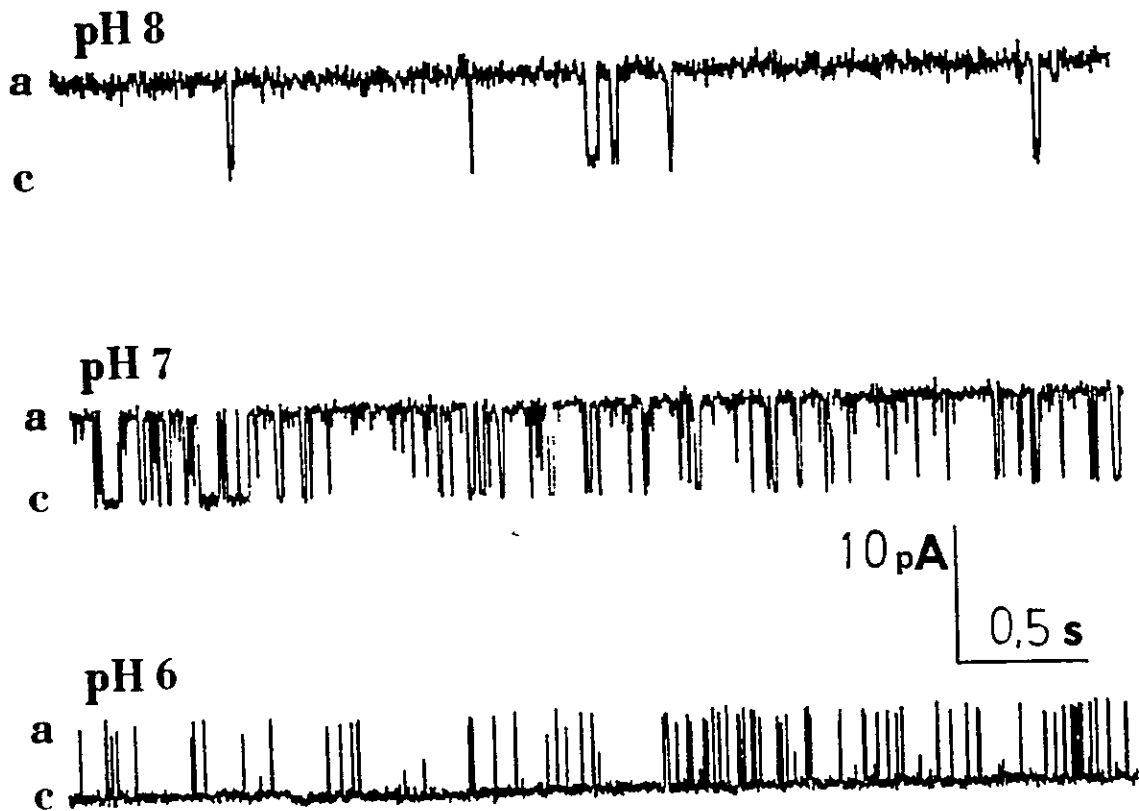


FIGURA 3

Registros de corriente de canal único a potencial y calcio constante a diferentes pH.

La figura muestra registros de corriente de canal único a una concentración intracelular de calcio de $100 \mu\text{M}$, un potencial aplicado de $+30 \text{ mV}$ y a tres pH diferentes. La probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto se obtuvo a partir del registro completo de corriente (alrededor de 60 s). Se puede observar que P_o disminuye al acidificar. Así, a pH 8, P_o es de 0,95, a pH 7 es de 0,6 y a pH 6 es de 0,1.

En la Tabla I se resumen los valores de V_0 , el potencial al cual P_0 es 0,5 y n , la valencia efectiva en diferentes grupos de experimentos en los que se varió el pH y la concentración de calcio. La valencia efectiva corresponde al valor de la pendiente de las curvas P_0 versus el potencial. Esta pendiente representa la dependencia del potencial con respecto a la cinética del canal. Aun cuando el mecanismo por el cual los canales transducen una diferencia de potencial a través de la membrana en un cambio conformacional es desconocido, uno puede especificar que la proteína posee partículas cargadas localizadas dentro del campo eléctrico que son movidas por éste. Estas partículas pueden ser ya sea iones o residuos de aminoácidos cargados localizados en la proteína-canal. El término $z\delta$ es llamado valencia efectiva (n) y representa el producto de las cargas (z) por la distancia fraccional (δ) del campo eléctrico en que estas cargas se mueven (ver Apéndice I).

Tal como se puede observar, la acidificación desplaza las curvas de activación en cada caso hacia la derecha en distintos grados. La valencia efectiva n , no cambia al acidificar y mantiene en general un valor promedio de 2,2 lo que indica que el pH no modifica la dependencia del potencial en la cinética del canal.

a.3.- Efecto del pH en los tiempos promedio abierto (T_a) y cerrado (T_c) del canal.

Los desplazamientos de las curvas de activación del canal se pueden explicar con base en modificaciones de los tiempos de permanencia promedio de éste tanto en el estado abierto como en el cerrado. Estos tiempos se obtienen a partir de histogramas de las duraciones tanto en el estado abierto como en el cerrado del canal, mediante el uso del método de máxima verosimilitud. Estos tiempos promedio son corregidos posteriormente tomando en cuenta que los eventos que duran menos que 1 ms han sido eliminados (ver Apéndice II). La figura 5 muestra histogramas de duraciones correspondientes al canal descrito en la Tabla I en el grupo I.

TABLA I

Valores de V_0 y n para diferentes experimentos realizados con canal único en función del potencial a diferentes pH y concentraciones de calcio.

Grupo	pH	[Ca] _i (μ M)	V_0 (mV)	$n(x \pm \text{Desv. estándar})$
I	7	100	-2,4	$2,8 \pm 0,03$
I	7	300	-24,0	$2,5 \pm 0,5$
I	5	100	43,5	$1,9 \pm 0,5$
I	5	300	23,0	$1,8 \pm 0,3$
II	7,5	25	-1,2	$2,2 \pm 0,1$
II	6	25	34,0	$2,0 \pm 0,3$
III	7,5	100	-7,7	$2,5 \pm 0,2$
III	6	100	14,0	$2,5 \pm 0,2$
IV	7,5	50	28,4	$2,3 \pm 0,2$
IV	6	50	32,4	$2,3 \pm 0,04$
V	7,5	20	6,6	$2,1 \pm 0,1$
V	5,5	20	22,0	$2,1 \pm 0,1$

Cada grupo representa experimentos realizados en un solo canal. La desviación estándar de los valores de V_0 fue despreciable para cada grupo, sin embargo, la variación entre grupos es bastante grande. La desviación estándar de n representa la dispersión de los puntos experimentales con respecto a una distribución de Boltzmann.

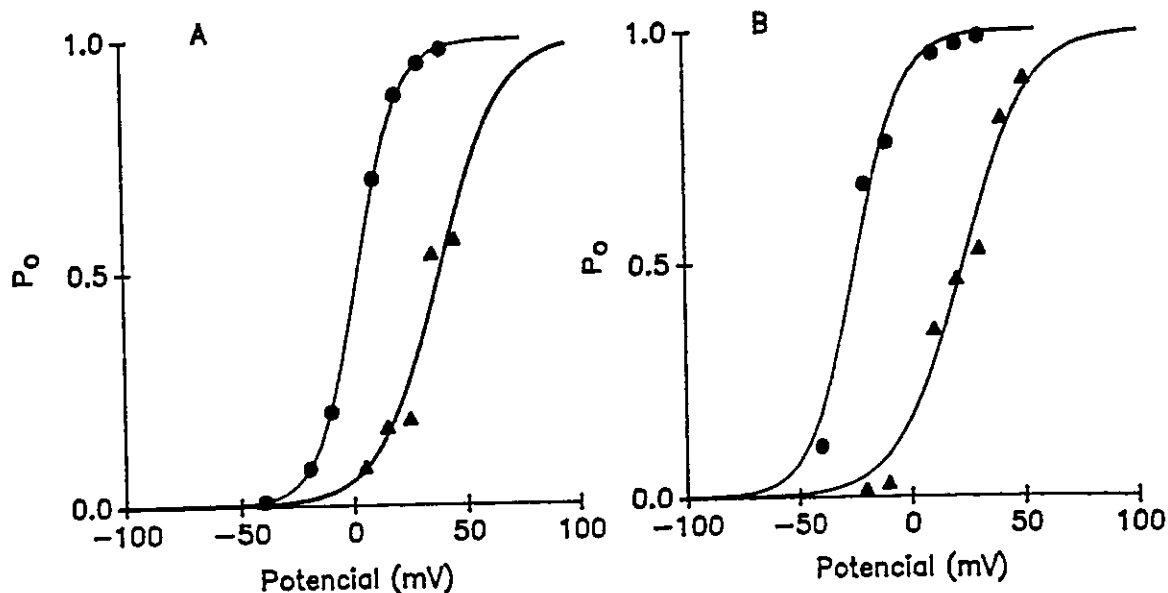


FIGURA 4

Efecto del pH en las curvas de activación del canal, en función del potencial.

La figura muestra curvas de la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto, P_o versus el potencial. Estos gráficos corresponden al experimento del grupo I descrito en la Tabla I. A: 100 μ M calcio. Los círculos corresponden a los resultados obtenidos a pH 7; los triángulos, pH 5. B: 300 μ M de calcio. Los símbolos representan los mismos pH descritos en A. Las líneas continuas corresponden al ajuste de una distribución de Boltzmann a los puntos experimentales (Apéndice I).

A partir de los valores de tiempos promedio corregidos abierto y cerrado obtenidos de estos histogramas, se construyeron los gráficos de la figura 6. Esta figura muestra el efecto del pH a 100 y 300 μM de calcio a distintos potenciales. Se puede observar que el tiempo promedio abierto disminuye al acidificar. En contraste, el tiempo promedio cerrado aumenta. Para este canal en particular, los T_a disminuyen más que lo que aumentan los T_c .

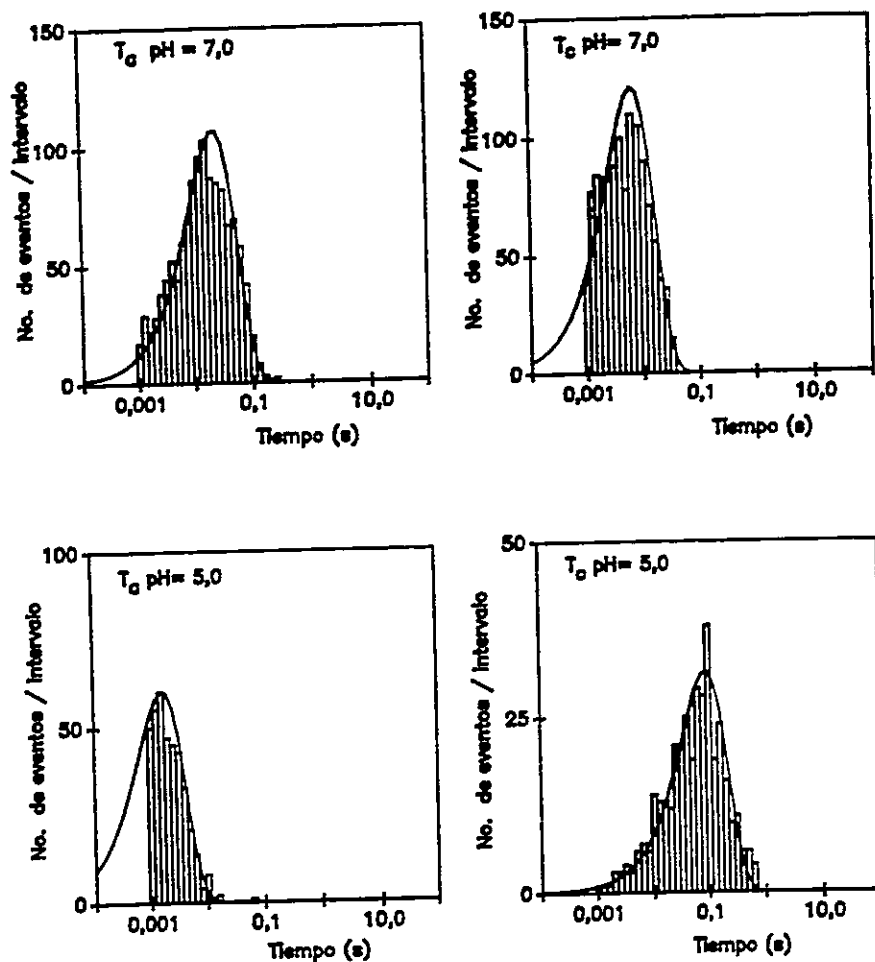


FIGURA 5

Histogramas de duraciones de canal único a calcio constante y dos pH.

La figura muestra un ejemplo de histogramas de duraciones correspondientes a dos pH y una concentración de calcio de $300 \mu\text{M}$ (ver Tabla I, experimento correspondiente al grupo I). Se puede observar que las distribuciones obedecen a una distribución simple con resolución temporal limitada (el tiempo mínimo es ≥ 1 ms). Los picos de las distribuciones representan los tiempos promedio abierto y cerrado. Estas se desplazan de manera que se disminuye el tiempo promedio abierto y se incrementa el tiempo promedio cerrado al acidificar (ver Tabla V).

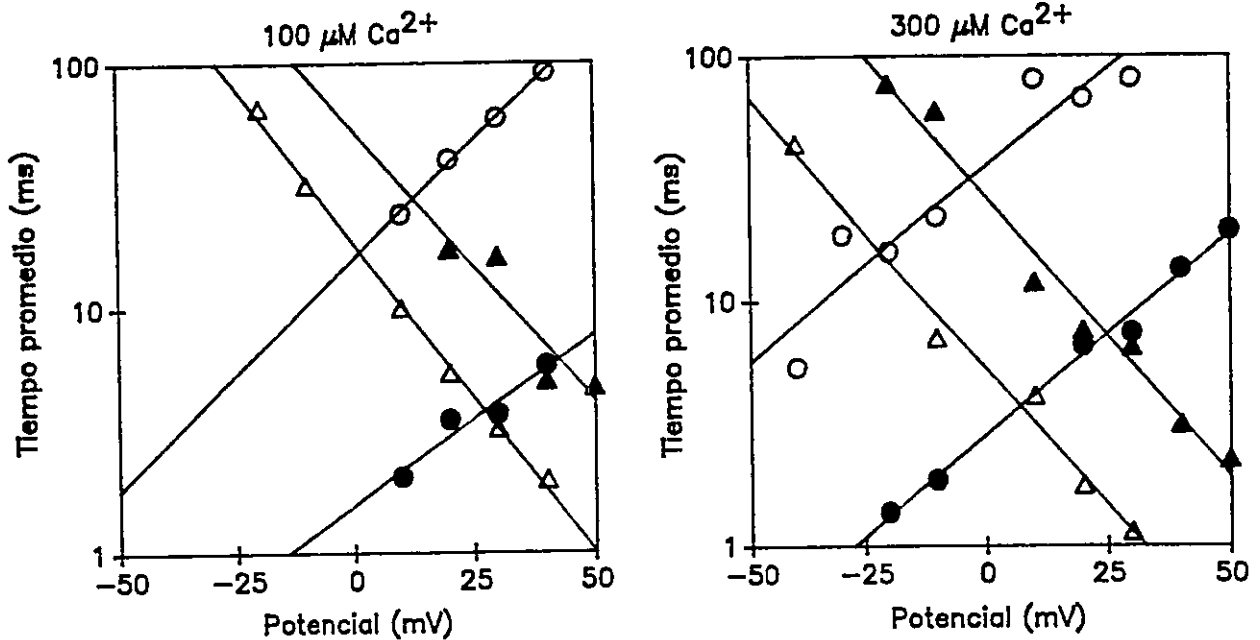


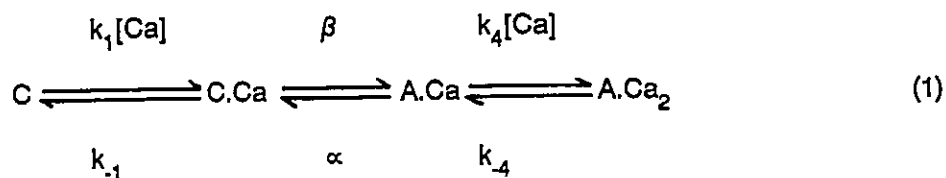
FIGURA 6

Efecto del pH en los tiempos promedio abierto y cerrado del canal versus el potencial.

Los tiempos promedio abierto se representan con círculos vacíos para pH 7,0 y llenos para pH 5,0. De forma similar, los tiempos promedio cerrado están graficados con triángulos vacíos para el pH 7,0 y llenos para el pH 5,0. Se puede observar que al acidificar los tiempos promedio abierto disminuyen y los tiempos promedio cerrados aumentan. Lo anterior se produce a ambas concentraciones de calcio. Las líneas continuas representan una regresión lineal de los puntos experimentales.

B.- Planteamiento del modelo.

Moczydlowski y Latorre (1983) plantearon un modelo que predice el comportamiento cinético del canal de potasio activado por calcio incorporado en membranas artificiales de fosfolípidos. Este modelo describe cuantitativamente la activación del canal por diferencias de potencial eléctrico y la unión de un agonista, el calcio, a pH constante. Por ello usaré este modelo como punto de partida, para incorporar posteriormente el efecto del pH. El esquema cinético está descrito como (R1) y es el siguiente:



Los estados marcados C corresponden a estados cerrados del canal; los marcados A son estados abiertos. α y β corresponden a las constantes cinéticas del proceso de apertura y cierre del canal; k_1 y k_4 son constantes cinéticas de pseudo-primero orden de unión de calcio a estados abierto y cerrado del canal, respectivamente.

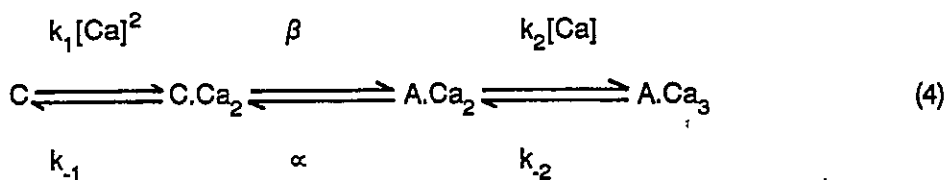
Este esquema cinético predice las siguientes relaciones lineales para los tiempos promedio abierto y cerrado. Estas fueron obtenidas de expresiones desarrolladas por Colquhoun y Hawkes (1977); Apéndice III:

$$T_a = (1/\alpha)(1 + [\text{Ca}]/K_d) \quad (2)$$

$$T_c = (1/\beta)(1 + K_1/[\text{Ca}]) \quad (3)$$

K_1 y K_4 son las constantes de disociación de las uniones de calcio al canal. El gráfico de T_a versus la concentración de calcio a potencial constante, nos entregará una curva que intercepta en el eje vertical en $1/\alpha$ y con una pendiente de $(1/\alpha K_4)$. De forma similar, el gráfico de T_c versus $1/[Ca]$ nos dará una curva que intercepta en el eje vertical en $1/\beta$ y con una pendiente de (K_1/β) .

Al graficar T_c versus $1/[Ca]$ tomando los valores corregidos de los tiempos promedio, se pudo observar que las curvas obtenidas a los tres pH estudiados interceptan en el eje vertical en un punto correspondiente a un valor negativo. Esta situación no se da si se realiza el gráfico de T_c versus $1/[Ca]$ tomando los valores de los tiempos promedio no corregidos por eventos perdidos tal como lo realizaron Mockzydowski y Latorre (figura 7). Esta observación tiene implicancias importantes para el modelo cinético presentado en (1) como se verá a continuación. El siguiente esquema cinético considera el proceso de activación del canal con tres calcio:



Este esquema predice las siguientes relaciones lineales para los tiempos promedio abierto y cerrado:

$$T_a = (1/\alpha)(1 + [Ca]/K_2) \quad (5)$$

$$T_c = (1/\beta)(1 + K_1/[Ca]^2) \quad (6)$$

En consecuencia, el tiempo promedio cerrado es ahora dependiente de $1/[Ca]^{2}$. Debido a lo anterior, el proceso de activación completa del canal requiere de la presencia de un tercer calcio. La incorporación de este tercer calcio se fundamenta en lo siguiente:

- a) La figura 8 muestra el gráfico de Hill de un canal a tres pH diferentes. Es interesante notar que los valores de las pendientes (número aparente de Hill, n_H) tienen un promedio de 2,0 sugiriendo que es necesario un mínimo de dos calcio para la completa activación del canal.
- b) El comportamiento cinético de este canal es bastante complejo. Magleby y Pallotta (1983) presentaron un modelo que incorporaba tres calcio en el proceso de activación completa del canal.

Este modelo modificado será entonces el que se usará para determinar el efecto del pH.

C.- Experimentos realizados a potencial constante, pH y calcio variables.

Las figuras 9 y 10 muestran el efecto del pH en los tiempos promedio abierto y cerrado de un canal en el que se pudieron realizar los experimentos más completos, a saber, se lograron tres pH (8,0 7,0 y 6,0) pudiéndose variar la concentración intracelular de calcio desde 20 a 100 μ M, a un potencial constante de 30 mV. Se puede observar que los tiempos promedio abierto disminuyen al acidificar. En contraste, los tiempos promedio cerrado aumentan.

NO CORREGIDO POR EVENTOS PERDIDOS

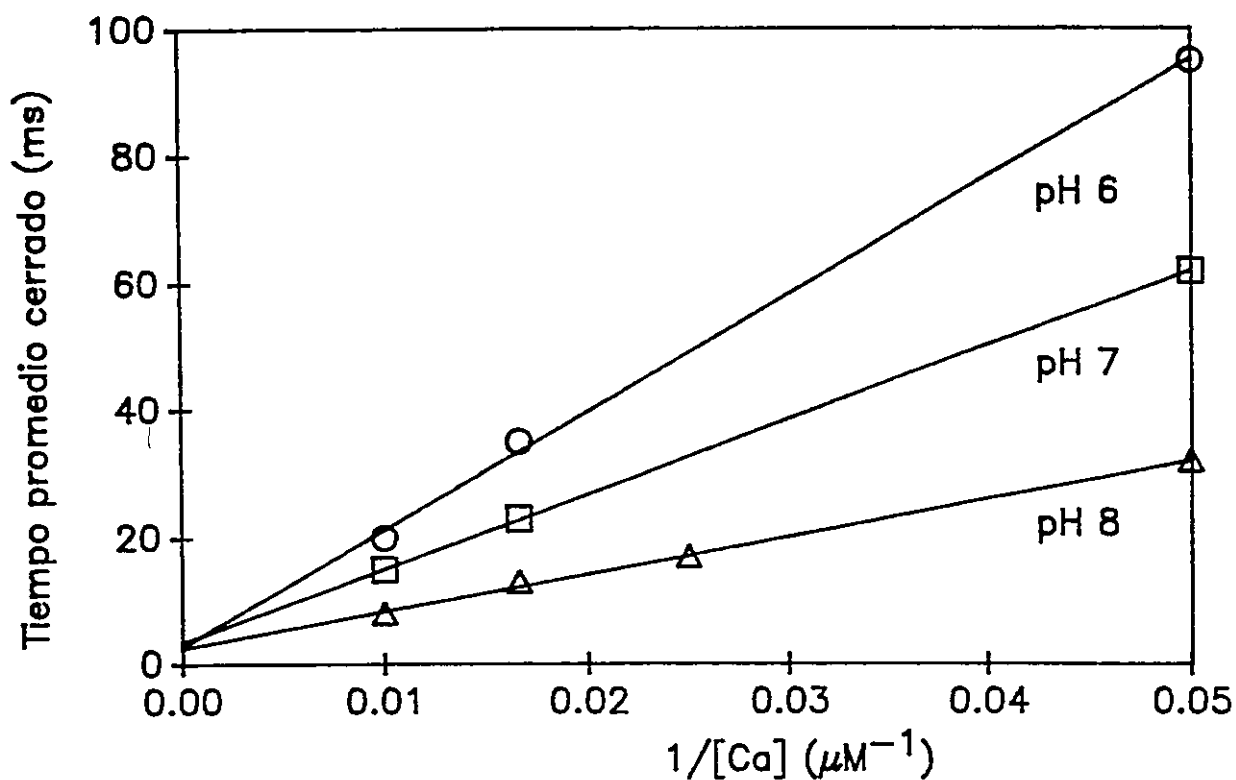


FIGURA 7

Efecto del pH en los tiempos promedio cerrado versus $1/[Ca]$, sin corregir por eventos perdidos.

La figura muestra la dependencia de los tiempos promedio cerrado con respecto a $1/[Ca]$ de un canal a potencial constante. En este gráfico se tomaron los valores de los tiempos promedio cerrados sin corregir por eventos perdidos. Se puede observar que la curva es similar a la de la figura 10, en que se corrigieron los tiempos promedio cerrado por eventos perdidos (ver además el Apéndice II).

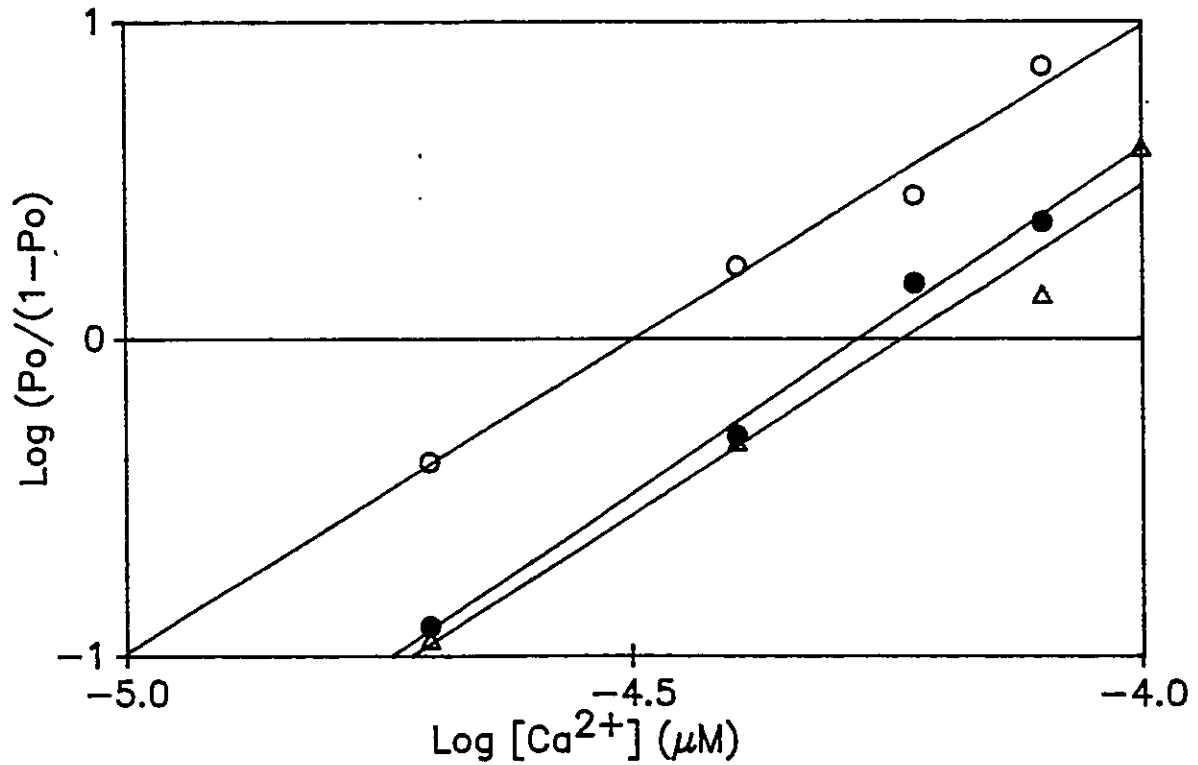


FIGURA 8

Efecto del pH en el gráfico de Hill.

La figura muestra el gráfico de $\log P_o/(1-P_o)$ versus $\log [Ca^{2+}]$ de un canal a +30 mV y tres pH. Los círculos vacíos representan el experimento realizado a pH 8,0. Los círculos llenos pH 7,0 y los triángulos, pH 6,0. Los valores de las pendientes de las curvas (n_H) fueron calculadas a partir de una regresión lineal de los puntos experimentales. Sus valores son los siguientes:

pH	n_H
8	$2,0 \pm 0,2$
7	$2,2 \pm 0,1$
6	$2,1 \pm 0,2$

Los valores de n_H representan el promedio \pm la desviación estándar de los puntos experimentales.

Es interesante notar que las curvas interceptan en un mismo punto a los tres pH estudiados. Esto indica que las constantes de las transiciones del canal (α y β) no se modifican. Por ende, de acuerdo al modelo presentado, el efecto del pH se manifiesta en la modificación de las constantes de disociación K_1 y K_2 tanto para el estado abierto como el cerrado del canal. Los valores calculados para las constantes de disociación K_1 y K_2 , así como de α y β se presentan en la Tabla II:

TABLA II

Valores de las constantes de disociación de calcio y de las transiciones abierto-cerrado del canal.

pH	Estado abierto		Estado cerrado	
	α^{-1} (ms)	K_2 (μ M)	β^{-1} (ms)	K_1 (nM ²)
8	5 \pm 1	2,4 \pm 0,7	3,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,7
7	5 \pm 1	48,3 \pm 11	3,5 \pm 0,1	4,6 \pm 1,4
6	5 \pm 1	108 \pm 24	3,5 \pm 0,1	9,4 \pm 0,4

Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar del intercepto y la pendiente de la regresión lineal de los puntos experimentales.

Tal como se observa en la Tabla II, los valores de K_1 y K_2 se incrementan al acidificar. Esto indica que la afinidad del calcio por los sitios de unión a la proteína-canal disminuye a medida que se incrementa la concentración de protones. Esto se ve reforzado al analizar la figura 8. El número aparente de Hill (n_H), que es un reflejo del número promedio de sitios de unión de calcio no se modifica al acidificar, pero disminuye la afinidad del calcio por los sitios de unión a la proteína-canal.

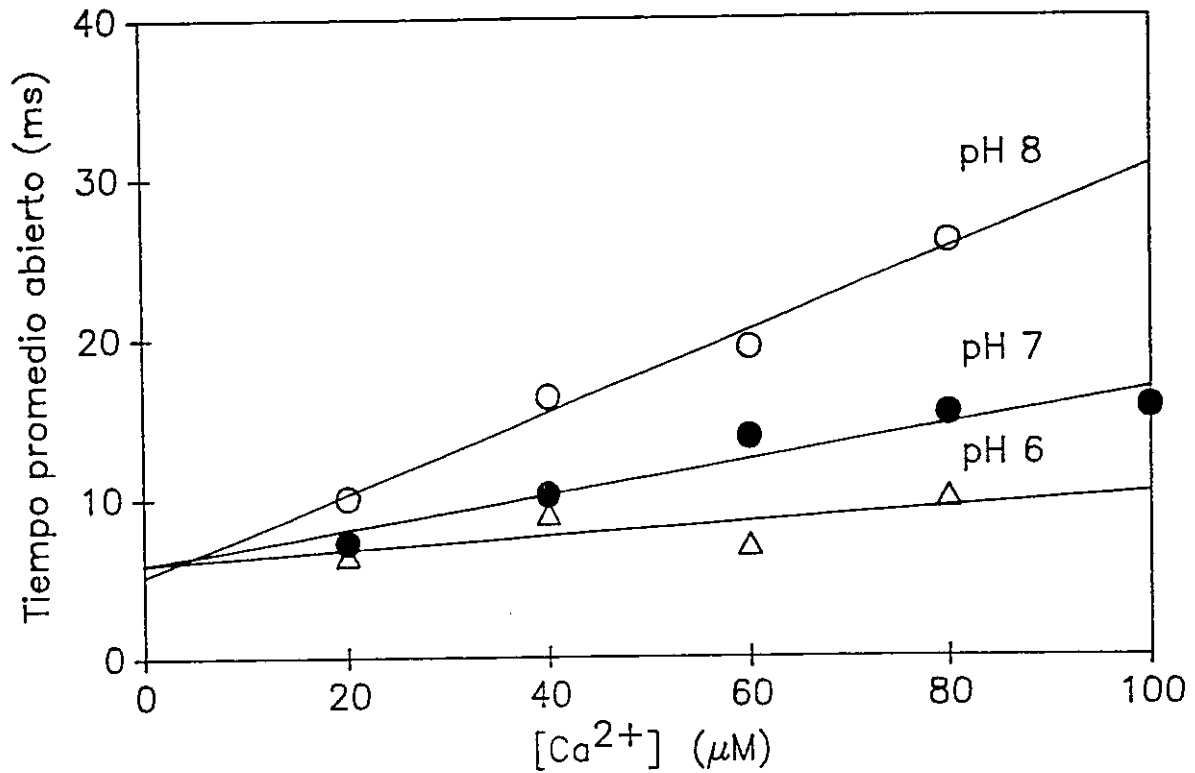


FIGURA 9

Efecto del pH en los tiempos promedio abierto del canal a potencial constante.

La figura muestra las relaciones lineales del tiempo promedio abierto versus la concentración de calcio a un potencial aplicado de +30 mV y a tres pH. Los valores de los tiempos promedio abierto fueron obtenidos de los histogramas de duraciones. Estos valores fueron posteriormente corregidos por eventos perdidos. Las líneas representan una regresión lineal de los puntos experimentales.

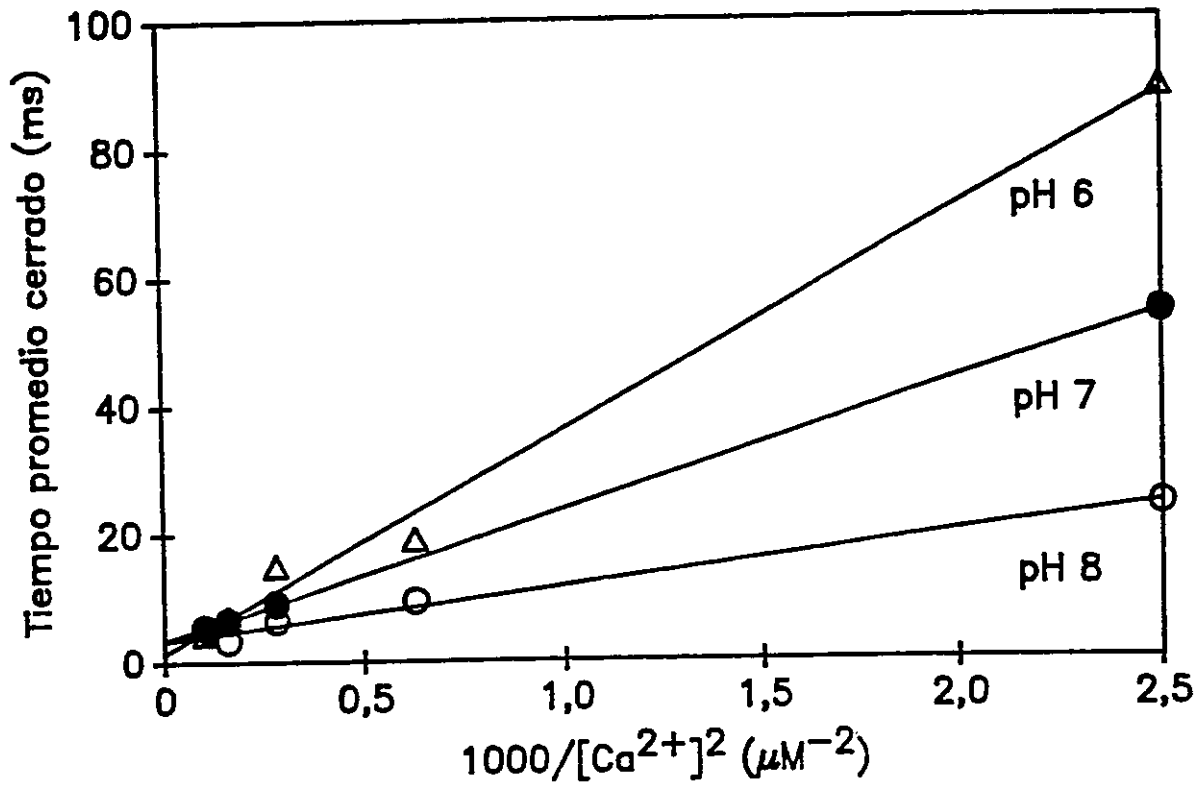
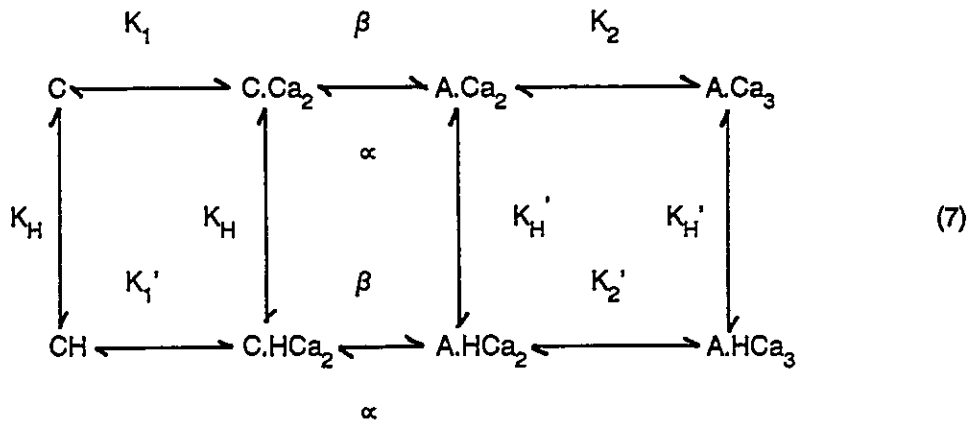


FIGURA 10

Efecto del pH en los tiempos promedio cerrado del canal a potencial constante.

La figura muestra las relaciones lineales del tiempo promedio cerrado versus $1/[Ca^{2+}]^2$. Los puntos experimentales fueron analizados tal como se describe en la figura 9.

Los antecedentes antes señalados sugieren que el canal presentaría uno o más sitios que al protonarse modificarían el sitio de unión de calcio del canal. Esto explicaría la disminución de la afinidad del calcio que se expresa en el desplazamiento de las curvas de activación hacia potenciales más despolarizantes. De acuerdo a lo anterior, el siguiente modelo incorpora el efecto del pH en la cinética del canal:



En este esquema el canal, dependiendo del pH, se encontraría desprotonado a un pH básico, protonándose a medida que se acidifica el lado intracelular del mismo. Al protonarse, la afinidad del calcio por los sitios de ligamen de calcio disminuiría. Este modelo general muestra que el canal puede protonarse en cualquiera de los estados abierto o cerrado. Sin embargo, con el propósito de simplificar las expresiones, se considerará a los estados abierto y cerrado de acuerdo a lo siguiente:





De esta manera, K_H y K_H' representan las constantes de equilibrio entre los estados protonados y desprotonados cerrado y abierto del canal, respectivamente. K_H queda definida de la siguiente manera:

$$K_H = ([C][H^+])/[CH] \quad (10)$$

De manera similar, para el estado abierto del canal:

$$K_H' = ([A][H^+])/[AH] \quad (11)$$

Despejando ambas expresiones y sacando logaritmo, se obtiene lo siguiente:

$$pH = pK_H + \log([C]/[CH]) \quad (12)$$

$$pH = pK_H' + \log([A]/[AH]) \quad (13)$$

La expresión (12) corresponde al canal en el estado cerrado y la (13) al estado abierto. Ambas expresiones muestran que la dependencia del pH del canal está relacionada con el valor de pK_H y la razón de canales desprotonados/protonados. Esta razón se puede expresar además de la siguiente manera:

$$([C]/[CH]) = (f/(1-f)) \quad (14)$$

Despejando f :

$$f = [C]/([C] + [CH]) \quad (15)$$

f entonces, representa la fracción del canal que se encuentra en el estado cerrado dependiente del pH. Por similitud, se obtiene una expresión para el estado abierto. La siguiente expresión relaciona a f con las constantes cinéticas del esquema (7):

$$K_{\text{exp}}(\text{pH}) = fK_1 + (1-f)K_1' \quad \text{Estado cerrado} \quad (16)$$

$$K_{\text{exp}}(\text{pH}) = fK_2 + (1-f)K_2' \quad \text{Estado abierto} \quad (17)$$

$K_{\text{exp}}(\text{pH})$ corresponde al valor de las constantes de disociación calculadas en función de los tres pH estudiados (Tabla II). Al despejar $f/(1-f)$ de las ecuaciones (16) y (17), se obtiene:

$$f/(1-f) = [(K_{\text{exp}}(\text{pH}) - K_1') / (K_1 - K_{\text{exp}}(\text{pH}))] \quad (18)$$

$$f/(1-f) = [(K_{\text{exp}}(\text{pH}) - K_2') / (K_2 - K_{\text{exp}}(\text{pH}))] \quad (19)$$

Incorporando el valor de la fracción $f/(1-f)$ en las ecuaciones (12) y (13) se obtiene lo siguiente:

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{H}} + \log\left[\frac{(K_{\text{exp}}(\text{pH}) - K_1')}{(K_1 - K_{\text{exp}}(\text{pH}))}\right] \quad (20)$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{H}}' + \log\left[\frac{(K_{\text{exp}}(\text{pH}) - K_2')}{(K_2 - K_{\text{exp}}(\text{pH}))}\right] \quad (21)$$

La ecuación (20) corresponde al estado cerrado; la (21) al estado abierto del canal. Los valores de K_1 , K_1' , K_2 y K_2' se obtuvieron mediante el planteamiento de un sistema de ecuaciones simultáneas que incluyó los valores de las constantes $K_{\text{exp}}(\text{pH})$ a diferentes pH. Los valores de $\text{p}K_{\text{H}}$ se obtuvieron por iteraciones sucesivas con un programa desarrollado en LOTUS de manera de obtener la mejor curva que pasa por los puntos experimentales. Los valores de las constantes se presentan en la Tabla III:

TABLA III

Constantes de disociación dependientes del pH.

Estado abierto	Estado cerrado
$K_2 = 15 \mu\text{M}$	$K_1 = 2 \text{ nM}^2$
$K_2' = 131 \mu\text{M}$	$K_1' = 11 \text{ nM}^2$
$\text{p}K_{\text{H}}' = 6,6$	$\text{p}K_{\text{H}} = 6,6$

Las figuras 11 y 12 muestran las curvas resultantes para el estado abierto y cerrado del canal respectivamente. Aun cuando el número de puntos experimentales obtenidos es de sólo tres, el ajuste es muy bueno en ambos casos.

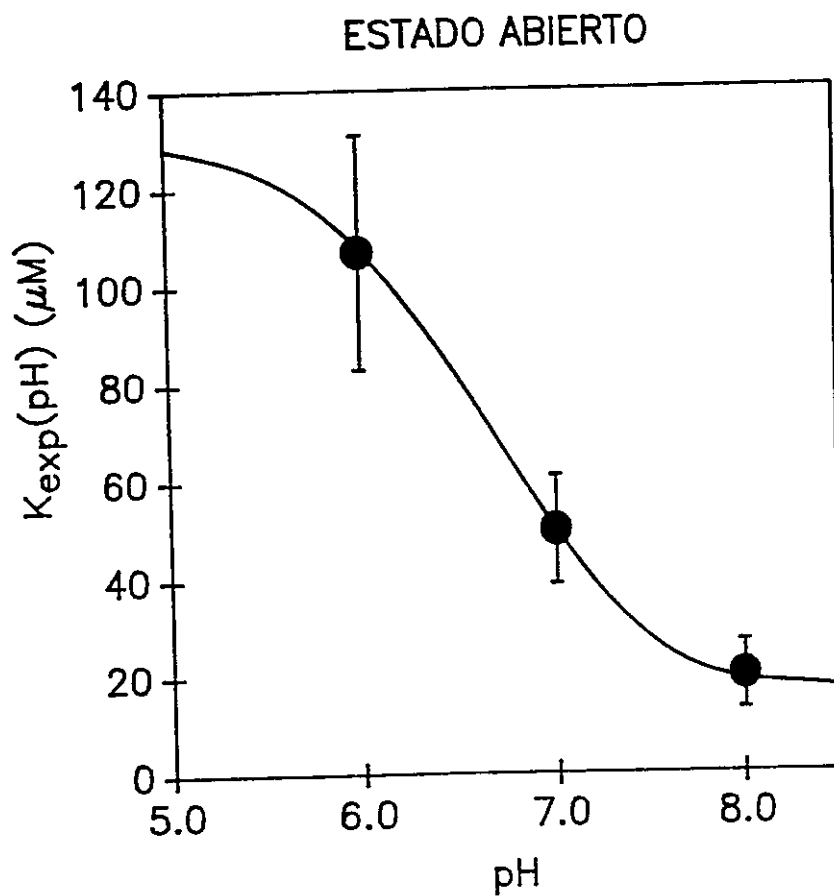


FIGURA 11

Aplicación del modelo cinético al estado abierto del canal.

La figura muestra la curva de ajuste de los valores experimentales de las constantes de disociación obtenidas a los tres pH estudiados. La línea continua representa la ecuación de Henderson-Hasselbalch graficada de acuerdo a los valores presentados en la Tabla III. Los puntos experimentales son el promedio \pm la desviación estándar de los valores de las pendientes obtenidas en la figura 9.

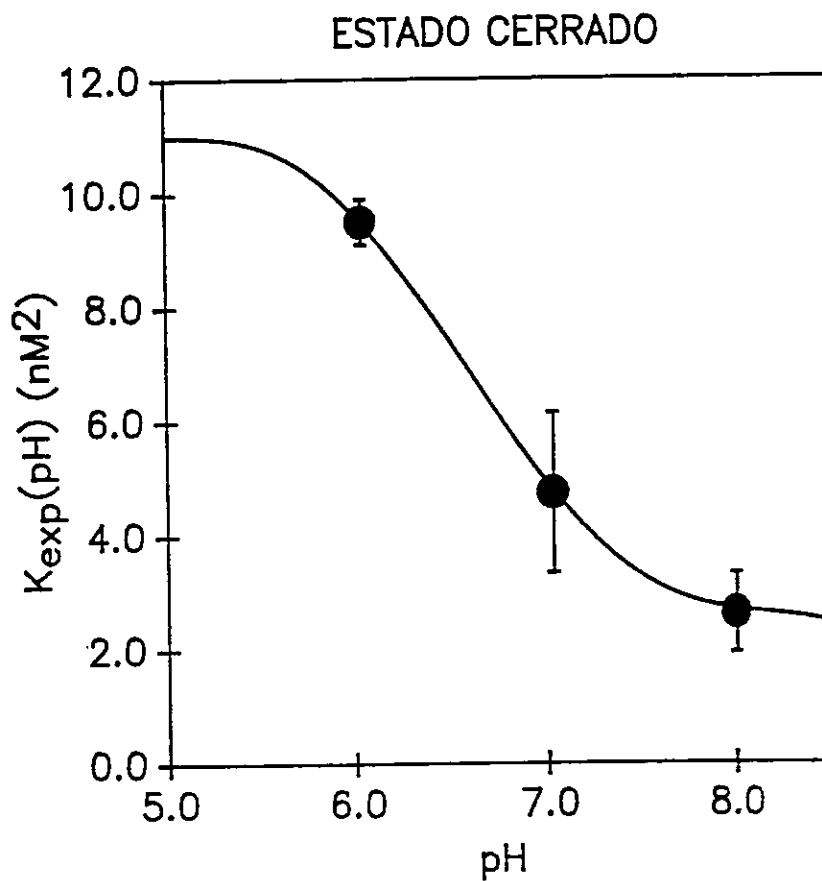


FIGURA 12

Aplicación del modelo cinético al estado cerrado del canal.

La figura muestra los valores ajustados para el estado cerrado del canal. Los puntos experimentales corresponden al promedio \pm la desviación estándar de las pendientes de la figura 10. La línea continúa se obtuvo de manera similar a la figura 11.

DISCUSION

A.- Comparación del efecto del pH en canales de potasio activados por calcio registrados de membranas nativas por la técnica de "patch-clamp" e incorporados en bicapas planas.

Los estudios del efecto del pH en canales de potasio activados por calcio en membranas nativas realizado usando el método de "Patch-clamp" (Cook y col. 1984 ; Christensen y Zeuthen, 1987), concuerdan con nuestras observaciones en el hecho de que la acidificación del lado citoplasmático del canal produce un desplazamiento de las curvas de activación del canal hacia la derecha. Esto se muestra en la Tabla IV.

TABLA IV

Efecto del pH en los valores de V_o obtenidos en canales únicos mediante el uso de la técnica de "patch-clamp".

	pH	[Ca] ⁱ (μ M)	V_o (mV)
Cook y col.(1984)	7,6	10	\approx -62
	7,2	10	\approx -49
	6,8	10	\approx -20
Christensen y Zeuthen (1987)	8,4	10	-6,3
	7,4	10	1,5
	6,4	10	34,4

La tabla muestra los desplazamientos de V_o en función del potencial en diferentes preparaciones. En general, V_o se mueve hacia potenciales más despolarizantes al acidificar el lado citoplasmático del canal. En los casos presentados, estos valores fueron obtenidos de análisis de canal único. Sin embargo, Cook y col. presentan resultados de parches de membrana que contenían más de un canal. En este caso se tomó una curva de activación analizada de un registro de canal único. Por ello, los valores son aproximados.

Aun cuando las condiciones experimentales han sido diferentes en cada trabajo, el efecto del pH es tal que siempre se produce un desplazamiento de las curvas de activación al acidificar el lado citoplasmático del canal. Los resultados presentados son canal-dependientes, en el sentido de que representan el comportamiento de un solo canal frente al calcio y pH. Por ello, estrictamente hablando, estos resultados no son comparables entre sí a nivel cuantitativo. Esto se fundamenta en lo siguiente:

a) La sensibilidad al calcio es diferente para cada canal.

Una manera simple de caracterizar la sensibilidad al calcio de un canal es el observar el valor de V_o a diferentes concentraciones de calcio. En general, la sensibilidad al calcio sufre variaciones importantes al compararla con diferentes canales. Para una concentración de calcio de $10 \mu\text{M}$, Christensen y Zeuthen encontraron variaciones en la sensibilidad al calcio entre diferentes parches de membrana para V_o de -18 a $+15$ mV. Por otro lado, Cook y col. a la misma concentración de calcio encontraron una variación en V_o de -55 a $+12$ mV. La Tabla I muestra los valores de V_o obtenidos en este trabajo para diferentes experimentos. Estas variaciones han sido descritas además por Moczydlowski y Latorre, 1983a.

b) Los experimentos deben realizarse en la presencia de canal único.

Las diferencias encontradas en la sensibilidad al calcio del canal discutidas anteriormente, hacen que solamente los registros de corriente obtenidos de canal único puedan ser estudiadas en forma cuantitativa. Las variaciones individuales respecto de la sensibilidad al calcio entre canales no permiten realizar estudios estadísticos del efecto del pH. Esta propiedad de los canales restringe en gran medida la posibilidad de realizar una variedad grande de

determinaciones. Así por ejemplo, en el estudio del canal presentado en la Tabla II, se realizaron quince adiciones de calcio, tres perfusiones de la cámara de formación de la bicapa y se agitó la solución del lado cis en dieciocho oportunidades. Con todo estas perturbaciones, es muy probable la ruptura o daño de la bicapa. Esto se traduce en un experimento incompleto.

c) El comportamiento cinético del canal no es constante en el tiempo.

La probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto sufre modificaciones espontáneas en el tiempo. Así, no es infrecuente en registros de canal único cambios en P_o importantes, que pueden ser reversibles o irreversibles. Nuevamente, este fenómeno está presente también en membranas nativas, por lo que parece ser inherente a este y otros canales.

Sin entrar en mayores detalles, es muy probable que estos factores y otros especie o tejido dependientes, sean responsables de las diferencias encontradas en la dependencia del canal con respecto al pH.

d) Los cambios de pH no pueden ser menores que una unidad de pH.

Los valores de pH utilizados así como sus rangos fueron determinados previamente a partir de experimentos incompletos. Así, variaciones en la concentración de protones menores a una unidad de pH resultaron frecuentemente en una superposición de los valores de los tiempos promedio abierto y cerrado. Esto se debe a una dispersión de los datos experimentales. Por otro lado, los valores de pH utilizados no pueden ir hacia extremos muy ácidos o básicos, ya que se arriesga a desnaturar irreversiblemente el canal. En general, los valores presentados en el presente trabajo constituyen un rango seguro. Esto fundamentado en la reversibilidad encontrada en el comportamiento cinético del canal al retornar a pH 7, ya sea

desde pH 8 o pH 6.

B.- Hacia un entendimiento molecular del efecto del pH.

El pH afecta, independientemente de las condiciones experimentales y de las diferentes preparaciones utilizadas, la cinética del canal de forma reproducible. El incremento en la concentración citoplasmática de protones, o sea, el lado del canal sensible al calcio, produce una modificación en la afinidad aparente del calcio por los sitios de ligamen del canal. Esto conduce a pensar que los protones estarían produciendo fenómenos de competencia por los sitios de unión de calcio o que interactuarían con algún sitio que produciría una reducción en la afinidad del calcio por el canal. Esta última proposición será considerada en el presente trabajo.

El esquema cinético presentado en (4) constituye un modelo que permite explicar el efecto del pH en función del calcio a potencial constante. Este está basado en lo siguiente:

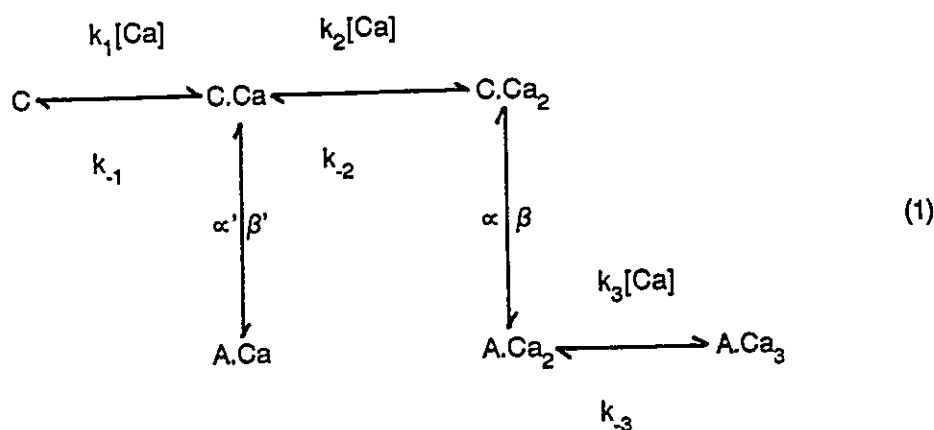
- a) La acidificación del lado intracelular del canal produce un desplazamiento de las curvas de activación del mismo hacia potenciales más hiperpolarizantes.
- b) Estos desplazamientos son producidos por una disminución del tiempo promedio abierto y un aumento del tiempo promedio cerrado del canal, al acidificar.
- c) El tiempo promedio cerrado es una función lineal de $1/[Ca]^2$. El tiempo promedio abierto es una función lineal de $[Ca]$.
- d) En el límite de cero calcio, los tiempos promedio abierto a potencial constante y diferentes pH (rango 8 - 6), convergen a un mismo valor, $1/\alpha$. De forma similar, los tiempos promedio cerrado a una concentración infinita de calcio en las mismas condiciones anteriores, convergen a un mismo valor, $1/\beta$.

e) Las funciones de distribución de probabilidad (pdf) (ver apéndice II) pueden ser descritas como una exponencial simple en el esquema (16) si los procesos que involucran a las constantes K_1 , K_1' , K_2 y K_2' son mucho más rápidos que las constantes de las transiciones abierto-cerrado del canal, α y β .

El modelo presentado requiere de la participación de dos calcio para que el canal experimente transiciones hacia el estado abierto y un tercer calcio que se incorporaría al estado abierto para estabilizar la configuración abierta y que explica la mantención del canal abierto por períodos largos de tiempo sin cerrarse. Este modelo es similar al presentado por Mockzydowski y Latorre (1983a), pero corregido para dar cuenta sólo de eventos que duran 1 ms o más. Es por lo anterior que la expresión para el T_c se describe como una función de $1/[Ca]^2$. Esto se fundamenta además al observar el número aparente de Hill (n_H) obtenido del gráfico $\log P_o/(1 - P_o)$ versus \log de la concentración de calcio. En este caso, se observa una relación lineal, siendo la pendiente n_H . La figura 8 muestra la situación a tres pH diferentes. Se puede observar que los valores para n_H tienen un promedio de 2,0. Este número indica el número mínimo de calcio necesarios para activar completamente el canal. Debido a las limitaciones que posee este método, no es posible determinar entonces el número "real" de calcio participantes. A modo de ejemplo, es conocido que el número de sitios de unión de oxígeno de la hemoglobina es cuatro. El número de Hill calculado para la hemoglobina es alrededor de dos. Esto se debe a que las interacciones ya sea de calcio con los sitios de ligamen de la proteína-canal u oxígeno con la hemoglobina no son del tipo "todo o nada", sino más bien se ubican en valores "intermedios" que tienden a subestimar el valor obtenido para el número de Hill. Por ello, se planteó la existencia de tres calcio en el modelo cinético de activación del canal. Este número dio cuenta satisfactoria de los resultados obtenidos.

Un modelo cinético del comportamiento del canal de potasio activado por calcio ha sido

descrito por Magleby y Pallota en membrana superficial de células musculares de rata en cultivo, usando la técnica de "Patch-clamp". Este modelo presenta similitudes con el modelo modificado de Mockzydłowski y Latorre propuesto en este trabajo. Este hecho es interesante, pues viene a confirmar que el comportamiento cinético del canal es similar en membranas nativas o reconstituido en bicapas artificiales de fosfolípidos. El modelo planteado por estos autores es el siguiente:

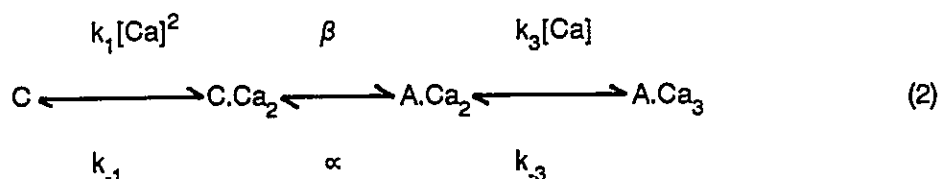


En que los estados marcados con C son cerrados y los con A abiertos. Las constantes cinéticas de unión de calcio están representadas por k_{1-3} ; las constantes cinéticas de las transiciones abierto-cerrado del canal son α, β, α' y β' .

Los valores de las constantes cinéticas calculadas por los autores para una concentración de calcio de $0,5 \mu\text{M}$, revelan que el tiempo promedio de permanencia del canal en el estado A.Ca es de $0,35 \text{ ms}$, correspondiendo a una distribución de aperturas muy breves. Al limitar las duraciones a valores $\geq 1 \text{ ms}$, se perderá el 94 % de estas aperturas. De forma similar, el estado C.Ca tiene también un tiempo de permanencia muy corto, por lo que ambos estados serán considerados como pertenecientes al estado C.

Por lo tanto, al eliminar los eventos que duran menos que 1 ms , el esquema cinético queda

reducido a:



Lo que corresponde exactamente al modelo cinético modificado de Mockzydowski y Latorre utilizado en este trabajo.

El valor calculado para el pK_H del canal obtenido en este trabajo resultó ser de 6,6 tanto para el canal en el estado abierto como en el cerrado. Este valor de afinidad del canal por los protones es menor que el descrito por Christensen y Zeuthen ($pK_H=7$). Aun cuando no es posible determinar a partir de los resultados presentados la naturaleza exacta de este valor de pK_H , es muy probable que sea el resultado de muchos grupos químicos presentes en la proteína-canal. Algunos de estos grupos pueden no participar directamente en la disminución de la afinidad del calcio del canal (por ejemplo, aquellos involucrados en la disminución de la conductancia del canal al acidificar). Debido a lo anterior, el efecto del pH en este canal resulta ser bastante complejo. Sin embargo, es posible realizar algunas especulaciones acerca del rol fisiológico del pH en el proceso de modulación del transporte de iones en este canal.

El valor de pK_H obtenido en el presente trabajo es menor que el pH intracelular (pH_i) medido en músculo esquelético, cuyo valor fluctúa entre 7,07 - 7,15 (Wray, 1988). Esto significa que al estar el pH_i alejado del pK_H , pequeñas modificaciones en el pH_i van a reflejarse en modificaciones importantes en la afinidad al calcio de los sitios de ligamen de calcio de la proteína-canal. Estos resultados permiten asignar al pH un rol modulador en la cinética del canal. En conclusión, el canal de potasio activado por calcio presentaría tres mecanismos de

control del flujo de iones a través de la membrana celular, a saber, la diferencia de potencial eléctrico, el calcio y el pH intracelular.

C.- Conclusion final.

El estudio del efecto del pH en el canal de potasio activado por calcio nos ha permitido entender el mecanismo de acción de los protones en la cinética del canal. Como resultado de estos estudios, se ha logrado plantear un modelo cinético de inhibición de la afinidad del calcio por los sitios de ligamen de calcio del canal debido a la presencia de uno o más sitios que se protonarían al acidificar el lado intracelular del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, P. R., Constantini, A., Brown, D.A., Clark, R. B. 1982. Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrate sympathetic neurons.
Nature 296: 746-749.
- Alvarez, O. 1986. How to set up a bilayer system.
En: Ion Channel Reconstitution. 115-130
Ed. C. Miller, Plenum Press, New York.
- Alvarez, O. y Latorre, R. 1978.
Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers.
Biophys. J. 21: 1-17.
- Begenisich, T. & Danko, M. 1983. Hydrogen ion block of the sodium pore in squid giant axons.
J. Gen. Physiol. 82:599-618.
- Blatz, A.L., Magleby, K.L. 1986. Correcting single channel data for missed events.
Biophys. J. 49:967-980.
- Cecchi, X., D., Alvarez, O. y Wolff, D. 1986. Characterization of a calcium activated potassium channel from rabbit intestinal smooth muscle incorporated into planar bilayers.
J. Membrane Biol. 91: 11-18.
- Christensen, O. y Zeuthen, T. 1987. Maxi K^+ channels in leaky epithelia are regulated by

Intracellular Ca^{2+} , pH and membrane potential.

Pflüger Arch. 408: 249-259.

Colquhoun, D. y Hawkes, A.G. 1977. Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels.

Proc. R. Soc. Lond. B. 199:231-262.

Colquhoun, D., y Sigworth, F.J. 1983. Fitting and statistical analysis of single-channel records (Cap. 11). En Single-Channel Recording. Editado por B. Sakmann y E. Neher. Plenum Press.

Cook, D.L., Ikeuchi, M., Fujimoto, W.Y. 1984. Lowering of pH inhibits Ca^{+2} -activated K^{+} channels in pancreatic β cells.

Nature 311:269-271.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B y Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 391:85-100.

Hanke, W. & Miller, C. 1983. Single chloride channels from Torpedo electroplax.

J. Gen. Physiol. 82:25-45.

Hille, B. 1968. Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve.

J. Gen. Physiol. 51:199-219

Kilmartin, J. V. y Rossi-Bernardi, L. 1973. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon

dioxide, and organic phosphates.

Physiol. Rev. 53:836-890.

Labarca, P., Coronado, R. y Miller, C. 1980. Thermodynamic and kinetic studies of the gating behavior of a K-selective channel from the sarcoplasmic reticulum membrane.

J. Gen. Physiol. 76: 397-424.

Latorre, R., Vergara, C. e Hidalgo, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -dependent K^+ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :805-809.

Magebly, K.L., y Pallotta, B.S. 1983. Calcium dependence of open and shut interval distribution from calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle.

J. Physiol. (London) 344:585-604.

Marty, A. 1981. Ca^{2+} dependent K^+ channels with large unitary conductance in cromaffin cell membranes.

Nature 291: 487-500.

Methfessel, C. y Boehm C. 1982. The gating of single calcium-dependent potassium channels is described by an activation-blockade mechanism.

Biophys. Struct. Meth. 9: 35-60.

Miller, C. 1983. Reconstitution of ion channels in planar lipid membranes : A five-year progress

report.

Comm. Mol. Cell. Biophys. 1:413-428.

Miller, C. y Racker, E. 1976. Fusion of phospholipid vesicles reconstituted with cytochrome C oxidase mitochondrial hydrophobic protein.
J. Membrane Biol. 26: 319-333.

Moczydlowski, E., Latorre, R. 1983a. Kinetics of Ca^{+2} -activated K^{+} -channels from rat skeletal muscle incorporated into planar lipid bilayers: evidence for two voltage-dependent Ca^{+2} binding reactions.
J. Gen. Physiol. 82:511-542.

Moczydlowski, E., Latorre, R. 1983b. Saxitoxin and ouabain binding activity of isolated skeletal muscle membrane as indicators of surface origin and purity. Biochem. Biophys. Acta 732:412-420.

Müller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T. y Wescott, W. 1963. Method for the formation of single bimolecular membranes in aqueous solutions.
J. Physiol. 277:153-176.

Nonner, W., Spalding, B.C. y Hille, B. 1980. Low intracellular pH and chemical agents slow inactivation gating in sodium channels of muscle.
Nature 284:360-363.

Pallota, B.S., Magleby, K.L., Barret, J.N. 1981. Single channel recording of Ca^{2+} -activated K^{+}

current in rat muscle cell culture.

Nature 293: 471-474.

Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C., Ikemoto, N. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle.

J. Biol. Chem. 256:8140-8148.

Sigworth, F.J., Sine, S.M. 1987. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms.

Biophys. J. 52:1047-1054.

Singer, S. y Nichols, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane.

Science 175: 720-731.

Vergara, C., Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca^{+2} -activated K^{+} -channels from rabbit skeletal muscle incorporated into planar bilayers: evidence for a Ca^{+2} and Ba^{+2} blockade.

J. Gen. Physiol. 82:543-568.

Virrarroel, A., Alvarez, O., Oberhauser, A., Latorre, R. 1988. Probing a Ca^{2+} -activated K^{+} channel with quaternary ammonium ions.

Pflüger Arch. 413: 118-126.

Wong, S., Lecar, H., Adler, M. 1982. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells.

Biophys. J. 39: 313-317.

Wray, S. 1988. Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function.(Revisión)

Am. J. Physiol. 254 (Cell Physiol.23): C213-C255.

APENDICE I

-Derivación de las ecuaciones usadas para los ajustes de las curvas de P_o versus el potencial.

Supongamos tener una canal con dos estados de conductancia, abierto y cerrado, con constantes cinéticas k_{12} y k_{21} que lo conectan de la siguiente manera:



Se define K_{eq} como la razón de las constantes de velocidad k_{21} y k_{12} de la siguiente manera:

$$K_{eq} = k_{12}/k_{21} \tag{2}$$

En el estado estacionario, $dP_o(t)/dt = 0$, con ello podemos calcular la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado abierto P_o , de acuerdo a lo siguiente:

$$dP_o/dt=0=-k_{21}P_o(t)+k_{12}(1-P_o(t)) \tag{3}$$

$$k_{21}P_o(t)=k_{12}(1-P_o(t)), \text{reordenando,}$$

$$P_o(t)=k_{12}/(k_{12}+k_{21}) \tag{4}$$

La constante de equilibrio de las transiciones es dependiente del potencial de acuerdo a una distribución de Boltzmann:

$$K_{eq} = k_{12}/k_{21} = \exp[-\Delta G^\circ(V)/RT] \quad (5)$$

El término $\Delta G^\circ(V)$ representa la diferencia de energía libre estándar entre ambos estados.

Además:

$$\Delta G^\circ(V) = -nF (V - V_o) \quad (6)$$

En que F es la constante de Faraday, n es el número de cargas eléctricas ("gating particles") que se mueven durante una transición abierto/cerrado y V_o es el potencial eléctrico en que $k_{12}/k_{21} = 1$. Reemplazando la ecuación (6) en (5) se obtiene:

$$K_{eq} = k_{12}/k_{21} = \exp[nF (V - V_o)/RT] \quad (7)$$

Por otro lado, resolviendo para P_o se obtiene:

$$P_o = k_{12}/(k_{12} + k_{21}) = [1/1 + (k_{21}/k_{12})] \quad (8)$$

$$P_o = 1 / \{1 + \exp[-nF (V - V_o)/RT]\} \quad (9)$$

APENDICE II

A.- Técnica de ajuste por máxima verosimilitud (Sigworth y Sine, 1987).

Cuando se realiza un experimento y se desea escoger los mejores valores de los parámetros (hipótesis) bajo estudio, es natural preguntarse cuál o cuales de ellos se ajustan mejor a nuestros datos experimentales. Así, nosotros podemos formular una hipótesis de trabajo y con ella observar la probabilidad de que esta de cuenta de los valores de los datos experimentales. Esta modalidad, que mantiene fija la hipótesis y variable los datos, es simplemente una distribución de probabilidades. Sin embargo, si nosotros deseamos analizar un experimento, es necesario mantener los datos fijos y variar la hipótesis de manera que se logre el mejor ajuste. Esta forma de mirar el problema se define como la verosimilitud de la hipótesis (V). Lo anterior se puede expresar de la siguiente manera:

Probabilidad de observar los datos, dada una cierta hipótesis \equiv Verosimilitud (V) de una hipótesis, dado ciertos datos. (1)

El método de máxima verosimilitud consiste precisamente en maximizar la expresión (1), o sea, en encontrar valores de parámetros que incrementen la probabilidad de obtener los datos experimentales.

a.1.- Máxima verosimilitud de una distribución exponencial simple.

Supongamos tener un canal que cumple con la siguiente función de distribución de probabilidades (pdf):

$$\text{pdf} = (1/T) (\exp (-t/T)) \quad (2)$$

En que T representa un valor hipotético de la constante de tiempo y t corresponde a una lista de N duraciones.

La pregunta es : ¿ Cual es la máxima verosimilitud del valor de T ?.

La verosimilitud (V) de N valores de las duraciones t_1, \dots, t_n es:

$$V = \pi (1/T)^N \times \exp -(\sum t_i/T) \quad (3)$$

Al sacar logaritmo natural, queda:

$$\ln V = -N \ln(1/T) - (\sum t_i/T) \quad (4)$$

Obteniendo la máxima verosimilitud:

$$d \ln V / dT = -N/T + 1/T^2 \sum t_i = 0 \quad (5)$$

Reordenando términos:

$$T = \sum t_i / N = \bar{t} \quad (6)$$

Lo que corresponde al promedio aritmético de las duraciones.

a.1.1.- Máxima verosimilitud de una distribución exponencial simple con resolución temporal limitada.

En el presente trabajo se limitaron las duraciones de los eventos a valores ≥ 1 ms. Por ello, el rango de observaciones está restringido a valores de duraciones desde un t_{\min} a infinito. Esto requiere formular una pdf modificada que incluya sólo los eventos ≥ 1 ms. La probabilidad de que una observación sea mayor que un t_{\min} es:

$$P(t \geq t_{\min}) = \exp(-t_{\min}/T) \quad (7)$$

Con lo que la pdf modificada queda de la siguiente manera:

$$\text{pdf}' = ((1/T) \exp(-t/T)) / \exp(-t_{\min}/T) \quad t_{\min} < t < \infty \quad (8)$$

Reordenando:

$$\text{pdf}' = (1/T) \exp(-(t-t_{\min}))/T \quad (9)$$

Resolviendo por el método de máxima verosimilitud y por analogía con la expresión (2), se obtiene:

$$T = \bar{t} - t_{\min} \quad (10)$$

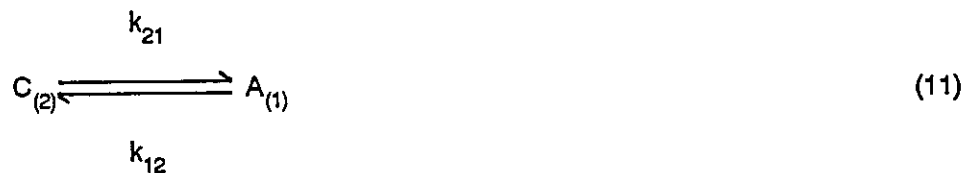
Al limitar la resolución temporal de las mediciones, las duraciones del canal que sean menores que 1 ms no van a ser resueltas. Esto introduce error en los valores de los tiempos promedio de permanencia observados con relación a los tiempos "reales", o sea aquellos que

se observarían si el sistema de adquisición de datos tuviera un ancho de banda infinito (situación que por lo demás, nunca se da).

Estos eventos del canal que se pierden debido a la resolución temporal de las mediciones, deben ser recuperados si queremos tener una representación más adecuada del comportamiento cinético del canal.

B.- Corrección por eventos perdidos (Blatz y Magleby, 1986 ; Seminarios Dr. O. Alvarez, 1988, 1989).

Supongamos tener un canal con dos estados de conductancia, uno abierto y otro cerrado:



Con tiempos promedio de permanencia observados iguales a:

$$L_{\text{obs}(2)} = 1/k_{21} \quad (12)$$

$$L_{\text{obs}(1)} = 1/k_{12} \quad (13)$$

La duración promedio de los intervalos abiertos observados $L_{\text{obs}(1)}$ es:

$L_{obs(1)}$ = Tiempo total observado / número de aperturas observadas.

$L_{obs(1)}$ = Duración total de todas las aperturas "verdaderas" + duración total de todos los intervalos cerrados perdidos sobre el umbral - la duración total de todos los intervalos abiertos perdidos bajo el umbral. (14)

Lo que se puede expresar de la siguiente manera:

$$L_{obs(1)} = (N t_{(1)} + N_{above(2)} T_{m(2)} - N_{below(1)} T_{m(1)}) / N_{obs(1)} \quad (15)$$

De forma similar, para el estado cerrado:

$$L_{obs(2)} = (N t_{(2)} + N_{above(1)} T_{m(1)} - N_{below(2)} T_{m(2)}) / N_{obs(2)} \quad (16)$$

En que:

N = Número total de aperturas "verdaderas"

$L_{(1)}, L_{(2)}$ = Duración promedio de los intervalos abierto y cerrado "reales" respectivamente.

$T_{m(1)}, T_{m(2)}$ = Duración promedio de los intervalos abiertos y cerrados, respectivamente.

$N_{above(1)}, N_{above(2)}$ = Número de intervalos abiertos y cerrados perdidos sobre el umbral, respectivamente.

$N_{below(1)}, N_{below(2)}$ = Número de intervalos abiertos y cerrados perdidos bajo el umbral, respectivamente.

$N_{obs(1)}, N_{obs(2)}$ = Número de eventos observados en el estado abierto y cerrado, respectivamente.

El número de eventos observados (N_{obs}) para el estado abierto o cerrado va a depender del número de eventos que logren pasar el umbral de discriminación del sistema de medición. Al estar limitada la resolución del mismo, algunos de ellos no lograrán pasar el umbral y por ende serán perdidos. Definiremos $F_{m(i)}$ a la fracción de eventos perdidos en el estado abierto ($i=1$) o cerrado ($i=2$). De forma similar, $F_{c(i)}$ representará la fracción de eventos capturados para el estado abierto o cerrado. Así, por ejemplo:

$$N_{obs(1)} = N [(F_{c(2)} F_{c(1)}) + (F_{c(2)} F_{m(1)} F_{m(2)} F_{c(1)}) + (F_{c(2)} F_{m(1)} F_{m(2)} F_{m(1)} F_{m(2)} F_{c(1)}) + \dots +]$$

Así, el término de esta expresión, $(F_{c(2)} F_{c(1)})$ nos dice que hubo un evento abierto capturado y un evento cerrado capturado. El segundo término nos indica que hubo un evento abierto capturado, un evento cerrado perdido, un evento abierto perdido y un evento abierto capturado. El tercer término nos dice que hubo un evento abierto capturado, dos eventos cerrados y abiertos perdidos y un evento cerrado capturado. Lo anterior representa entonces, las posibles modalidades de captura y pérdida de eventos del canal que influyen en el valor de N_{obs} . La expresión (17) se puede generalizar de la siguiente manera:

$$N_{obs(1)} = N [F_{c(2)} F_{m(1)} \sum (F_{m(1)})^i (F_{m(2)})^i] \quad (18)$$

Por otro lado, se sabe que:

$$\sum x^i = 1/(1-x) \quad \text{si } x < 1. \quad (19)$$

Con lo que la expresión final para N_{obs} queda de la siguiente manera:

$$N_{obs(1)} = N F_{c(2)} F_{c(1)} / (1 - F_{m(1)} F_{m(2)}) \quad (20)$$

Siguiendo un razonamiento similar, se pueden obtener las expresiones para N_{above} y N_{below} . Estas son:

$$N_{\text{above}(1)} = N F_{c(2)} F_{m(1)} / (1 - F_{m(1)} F_{m(2)}) \quad (21)$$

$$N_{\text{below}(1)} = N F_{c(2)} F_{m(1)} / (1 - F_{m(1)} F_{m(2)}) \quad (22)$$

Lo anterior es válido también para $N_{\text{obs}(2)}$, $N_{\text{above}(2)}$ y $N_{\text{below}(2)}$ si se cambian los sub índices.

Las expresiones (20-22) se pueden ahora incorporar en $L_{\text{obs}(1-2)}$.

Las expresiones para F_m y F_c son modelo dependientes. En este caso se parte de un modelo de dos estados y se conoce por ende su pdf. De esta manera, la fracción de eventos perdidos corresponde a todos los eventos $\leq t_{\text{min}}$. La fracción de eventos capturados es aquella que incorpora los eventos mayores que t_{min} . Estas son:

$$F_{m(1)} = 1 - \exp(-t_{\text{min}}/L_{(1)}) \quad (23)$$

$$F_{c(1)} = 1 - F_{m(1)} = \exp(-t_{\text{min}}/L_{(1)}) \quad (24)$$

El tiempo promedio perdido es:

$$T_{m(1)} = \int_0^{t_{\text{min}}} \text{pdf } t \, dt / \int_{t_{\text{min}}}^{\infty} \text{pdf } dt \quad (25)$$

$$T_{m(1)} = [L_{(1)} - (L_{(1)} + t_{\min}) \exp(-t_{\min}/L_{(1)})] / [1 - \exp(-t_{\min}/L_{(1)})] \quad (26)$$

Reemplazando (23,24 y 26) en las expresiones (15-16) se obtiene:

$$L_{\text{obs}(1)} = (L_{(1)} + L_{(2)}) \exp(-t_{\min}/t_{(2)}) - L_{(2)} \quad (27)$$

$$L_{\text{obs}(2)} = (L_{(1)} + L_{(2)}) \exp(-t_{\min}/L_{(1)}) - L_{(1)} \quad (28)$$

Los valores de $L_{(1-2)}$ se pueden calcular a partir de $L_{\text{obs}(1-2)}$. Para ello se usa el siguiente sistema de ecuaciones simultáneas:

$$L_{\text{obs}(1)} = L_{\text{obs}(1)}^{\circ} + dL_{\text{obs}(1)} \Delta L_{(1)}/dt_{(1)} + dL_{\text{obs}(1)} \Delta L_{(2)}/dt_{(2)} \quad (29)$$

$$L_{\text{obs}(2)} = L_{\text{obs}(2)}^{\circ} + dL_{\text{obs}(2)} \Delta L_{(1)}/dt_{(1)} + dL_{\text{obs}(2)} \Delta L_{(2)}/dt_{(2)} \quad (30)$$

La idea es poner un valor estimado de $L_{(1)}$ y $L_{(2)}$ y calcular con estas estimaciones, $L_{\text{obs}(1-2)}^{\circ}$. Luego se itera hasta que $\Delta L_{(1)} = \Delta L_{(2)} = 0$.

(Estas ecuaciones fueron implementadas en un programa de computación realizado por el Dr. Osvaldo Alvarez.)

Los valores obtenidos para $L_{(1)}$ y $L_{(2)}$ se pueden incorporar ahora en la expresión (10).

La tabla V muestra los valores de $L_{\text{obs}(1-2)}$ y $L_{(1-2)}$ tomado del experimento mostrado en la figura 5.

TABLA V

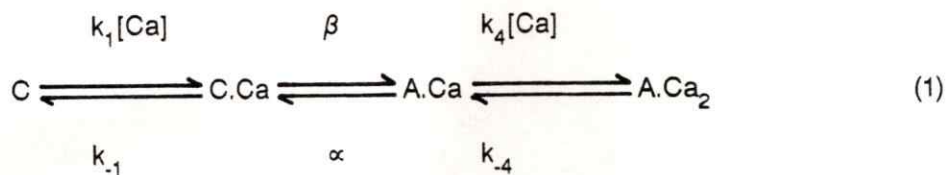
-Valores de L_{obs} para el estado abierto y cerrado del canal y sus valores corregidos, a dos pH.

	No corregido		Corregido	
	$L_{abierto}$ (ms)	$L_{cerrado}$ (ms)	$L_{abierto}$ (ms)	$L_{cerrado}$ (ms)
pH 7	26,0	7,3	22,0	7,0
pH 5	2,0	102	1,9	59,0

APENDICE III

-Derivación de las expresiones para los tiempos promedio abierto y cerrado del canal.

Consideraremos el siguiente esquema cinético de activación del canal:



La siguiente expresión permite calcular el tiempo promedio cerrado del canal (Colqhoun y Hawkes, 1977):

$$T_c^{-1} = \beta ([\text{C.Ca}] / ([\text{C.Ca}] + [\text{C}])) \quad (2)$$

Esta ecuación especifica que T_c^{-1} es igual al producto de la constante cinética que permite salir del estado cerrado (β) por la fracción del estado cerrado en el equilibrio ($[\text{C.Ca}] / ([\text{C.Ca}] + [\text{C}])$). La función inversa de la ecuación (2) nos permite conocer T_c :

$$T_c = (1/\beta)(1 + [\text{C}]/[\text{C.Ca}]) \quad (3)$$

Por otro lado, definiremos K_1 como la constante de disociación de calcio del esquema cinético, de la siguiente manera:

$$K_1 = ([\text{C}][\text{Ca}] / [\text{C.Ca}]) \quad (4)$$

Combinando (3) y (4), se obtiene finalmente la expresión para el tiempo promedio cerrado no condicional:

$$T_c = (1/\beta)(1 + K_1/[Ca]) \quad (5)$$

De forma similar, para el tiempo promedio abierto del canal se tiene:

$$T_a^{-1} = \alpha ([A.Ca]/([A.Ca] + [A.Ca_2])) \quad (6)$$

$$T_a = (1/\alpha)(1 + ([A.Ca_2]/[A.Ca])) \quad (7)$$

K_4 , la constante de disociación de calcio se define de la siguiente manera:

$$K_4 = [A.Ca][Ca]/[A.Ca_2] \quad (8)$$

Combinando (7) y (8), se obtiene la expresión final para el T_a :

$$T_a = (1/\alpha)(1 + [Ca]/K_4) \quad (9)$$

Estas expresiones corresponden al esquema (1) de la sección Resultados. El esquema (4) de la misma sección se obtiene siguiendo el mismo razonamiento. La única diferencia consiste en reemplazar la concentración de calcio en el estado cerrado por $[Ca]^2$ y el subíndice de la constante de disociación de calcio del estado abierto por K_2 .