

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE POTASIO
ACTIVADO POR CALCIO DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA 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 Biología.

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Enrique Flavio Estrada Dinamarca



Santiago, Diciembre de 1991
Profesor guía : Dr. Ramón Latorre.

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

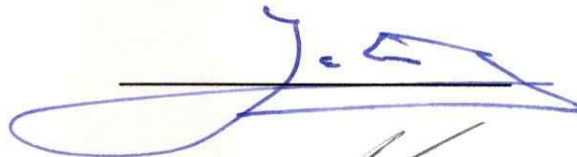
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

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

ENRIQUE FLAVIO ESTRADA DINAMARCA

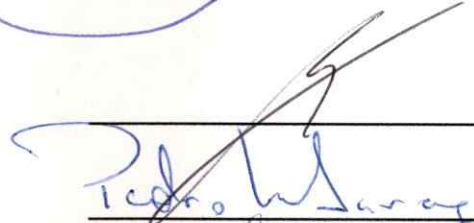
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Fisiología.

Director de Tesis :
Dr. Ramón Latorre

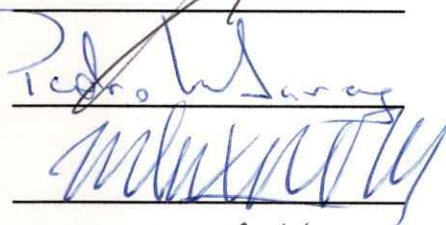


Comisión Informante de Tesis :

Dr. Osvaldo Alvarez



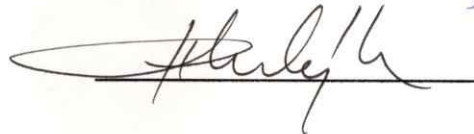
Dr. Pedro Labarca



Dr. Mario Luxoro



Dr. Benjamín Suarez



A Eliana y nuestro invitado a la vida, Daniel.



AGRADECIMIENTOS

Hace mucho tiempo elegí conocer la vida en esta escuela, así ha sido. Humberto Maturana me abrió la puerta y la mollera al comienzo. Aprendí a conocer y querer a las plantas en cada centímetro del país que caminé con Carolina Villagrán y Mary Kalin junto a otros aprendices. Después no se que me dió (tal vez los aires de renuevo que llegaron en 1984) y quise conocer las fronteras. Un tipo de frontera (la membrana celular) me la enseñaron Cecilia Hidalgo y Tulio Nuñez. De pronto casi me pierdo, David Naranjo y Ramón Latorre me mantuvieron en la trocha del camino (Strata?). Finalmente aprendí la disciplina y el valor de la fortaleza con esos pequeños demonios llamados canales iónicos, en este taller llamado Laboratorio de Fisiología, mis Maestros: Osvaldo, Ximena, Cecilia, Ramón, David, Daniel, Juan B., Juan E., y Pedro. A mis compañeros aprendices: Marcelo, Luisa, Ricardo, Heidi, Rodrigo, Bernardo, Nata, Marco Antonio, Paty, Felipe, Sebastián, Orlando y los pollitos. Lizzi siempre tuvo una sonrisa, vale. Los que partieron, Andrés y Carmen. El cariño de Juan V. y Anita. Ustedes han sido mi familia, fuente de vivencias y aprendizaje. Es decir, soy un Biólogo. Un agradecimiento al Centro de Estudios Científicos de Santiago, por el aporte hecho en diversos aspectos de mi formación.



INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1.-INTRODUCCION	1
1.1 Naturaleza de los modelos de abertura y cierre y de conducción de un canal iónico genérico.	3
1.2 Un canal iónico visto como un sistema termodinámico.	7
1.3 El canal de potasio activado por calcio, ubicado en el túbulo transversal del músculo esquelético, como modelo experimental.	9
1.4 El proceso de abertura y cierre en el canal de K ⁺ activado por calcio.	10
1.5 El proceso de conducción de iones en el canal de K ⁺ activado por calcio.	11
2.- METODOS	13
2.1 Incorporación del canal de K ⁺ activado por Ca ²⁺ en la bicapa de lípidos.	13

2.2 Experimentos de variación de la temperatura.	25
2.3 Análisis de la actividad del canal de K^+ activado por Ca^{2+} , a diferentes temperaturas.	28
3.- RESULTADOS	34
3.1 Efecto de la temperatura en el proceso de abertura y cierre en el canal de K^+ activado por Ca^{2+} .	34
3.2 Efecto de la temperatura sobre la conductancia.	57
4.- DISCUSION	61
4.1 El proceso de abertura y cierre del canal de potasio activado por calcio.	61
4.2 El proceso de conducción de iones.	73
5.- CONCLUSIONES	75
6.- BIBLIOGRAFIA	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de flujos de la obtención de datos.	21
Figura 2	Efecto de la temperatura sobre la cinética de abertura y cierre del canal de potasio activado por calcio.	36
Figura 3	Activación por potencial del canal de K^+ activado por Ca^{2+} .	40
Figura 4	Efecto de la temperatura sobre los tiempos promedio abierto y cerrado.	45
Figura 5	Distribución de los tiempos de residencia de los estados abierto y cerrado en función de la temperatura y de la concentración de calcio.	50
Figura 6	Efecto de la temperatura en la conducción del ion potasio.	58

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Curva de activación.	42
Tabla II	Tiempos promedio abierto y cerrado a diferentes temperaturas y concentraciones de calcio.	53
Tabla III	Valores termodinámicos del proceso de activación del canal.	56
Tabla IV	Valores de la conductancia unitaria y la conductividad límite equivalente.	60

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

F	: Constante de Faraday
h	: Constante de Planck
H_{act}	: Entalpía de activación
k_B	: Constante de Boltzmann
KHz	: Kiloherzt, 10^3 Hertz.
MOPS	: Acido 3-(-N-morfolino) propanosulfónico
mV	: Milivolts, 10^{-3} Volts.
pA	: Picoampere, 10^{-12} Amperes.
pF	: Picofaradios, 10^{-12} faradios.
P_o	: Probabilidad de encontrar el canal abierto
pS	: Picosiemens, 10^{-12} Siemens.
R	: Constante universal de los gases
S_{act}	: Entropía de activación
T	: Temperatura °K
tau	: Tiempo promedio
$V_{0,5}$: Potencial al cual P_o es igual a 0,5
z	: Valencia del ion.

RESUMEN

En esta tesis se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad del canal de K^+ activado por Ca^{2+} , de membranas purificadas del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de la rata. Este canal fue reconstituido en un sistema de bicapas planas de fosfolípidos. El objetivo de estos experimentos fue evaluar los cambios en la entropía y entalpía para el proceso de abertura y cierre como también para el proceso de conducción de potasio. Al evaluar el proceso de abertura y cierre, se muestra que la abertura va acompañada de un aumento en la entropía del canal. Se propone que la cinética de abertura y cierre es una consecuencia de la dinámica de despliegue parcial y repliegue de una α -hélice asociada a la compuerta del canal.

Considerando el proceso de conducción de potasio, se muestra evidencia de que este proceso es en esencia un fenómeno de difusión en el interior de la proteína, la cual proporciona un ambiente fisicoquímico con características que semejan las existentes en el seno de la solución. En el rango de temperatura estudiado, se demuestra que la entalpía de activación es constante y su valor es de 4,14 kcal / mol. Este valor experimental es similar en magnitud a aquel obtenido por Villarroel(1989), quién lo obtuvo haciendo un ajuste a un modelo de barreras.

ABSTRACT

In this thesis the effect of the temperature on the $[Ca^{2+}]$ -activated potassium channel reconstituted in to planar lipid bilayers was investigated. The aim of these experiments was to evaluate the enthalpic and entropic contributions associated to the gating and potassium conduction processes in this channel.

The results showed that the close to open transition increases the entropy of the system. It is postulated that the gating process is a consequence of the partial folding and unfolding dynamics of an α -helix associated to the channel activation gate.

Regarding the potassium conduction process, it is shown that this is essentially a diffusion phenomenon in the protein core. In all the temperature range studied the enthalpy of activation is constant and amounts to 4.14 kcal/mol. This energy is similar in magnitude to that obtained by Villarroel(1989) using a energy barriers model for to explain the conduction data of this channel.

1.- INTRODUCCION

La termodinámica es una disciplina de la física que considera los flujos de energía asociados a los cambios de estados de un sistema. Su valor radica en la capacidad de predecir los probables estados de un sistema, conociendo la magnitud y sentido de los flujos de energía, de manera independiente del mecanismo que propicia esos cambios de estado. El complemento necesario para la caracterización completa del sistema, es la proposición de un mecanismo (una trayectoria) por el cual el sistema cambia de estado. Sin lugar a duda, ambas visiones deben ser coherentes en la explicación de los cambios de estado del sistema.

En una célula existen muchas formas de energía, cuyos flujos son determinantes en la mantención de su integridad fisiológica. En este contexto, los canales iónicos, que son proteínas integrales de membrana y que median el flujo pasivo de iones a través de una bicapa de lípidos, tienen una importancia fundamental, pues su estructura permite que una forma de energía específica (por ejemplo el impacto de un fotón, tensión mecánica, potencial eléctrico, la unión de un neurotransmisor, etc.), permita o inhiba el flujo de iones impulsados por una gradiente electroquímica, la cual es otra forma de energía que la célula utiliza en numerosos mecanismos de respuesta celular.

Visto así, los canales iónicos son transformadores (transductores) de energía y una pregunta relevante, es cómo realizan esta transformación. Vale decir, una pregunta acerca del mecanismo que de cuenta de la magnitud y sentido del flujo de iones (proceso de conducción iónica) y por otro lado, una pregunta acerca del mecanismo que considere cuáles son los cambios inducidos en la proteína, debido a un estímulo (energía) específico, los que a su vez determinan que el canal iónico conduzca (estado abierto) o no (estado cerrado) iones.

Un cambio conceptual dirigido a responder ambas preguntas, ha ocurrido desde el momento que fue posible reconstituir en un sistema artificial de bicapas planas de lípidos la actividad de estas proteínas naturales. Del cúmulo de evidencia experimental en diferentes tipos de canales iónicos, provenientes de diversos tipos de membranas, se han elaborado modelos particulares que responden las dos preguntas acerca de los procesos involucrados en el mecanismo de transducción de energía.

1.1.- Naturaleza de los modelos de abertura y cierre y de conducción de un canal iónico genérico.

El método de reconstitución en bicapas planas de lípidos, permite tomar una muestra estadística de la actividad de un canal iónico, midiendo los cambios de magnitud y sentido de los flujos iónicos, debido a la aplicación de un potencial eléctrico y en otras circunstancias un factor modulador (v.gr. un agonista), condiciones que simulan los cambios que ocurren en una membrana biológica.

Considerando el proceso de conducción iónica, el parámetro experimental relevante de este muestreo es la conductancia, que es simplemente la razón entre la magnitud de la corriente medida y el potencial eléctrico aplicado a través de la bicapa.

Una estrategia que ha resultado útil para describir el proceso de conducción iónica, ha sido el de hacer un ajuste estadístico de la relación corriente vs potencial experimental, con una relación corriente vs potencial teórica (ver Alvarez y cols, 1991). Esta relación teórica es construída a partir de la simulación de un modelo físico, el que considera que la travesía de un ión por el poro acuoso de un canal, en un régimen estacionario, es descrita por saltos de éste, a sitios donde la energía libre es un mínimo local. La ubicación de estos sitios son consecutivos en la

dirección del eje del poro. Cada vez que el ion realiza un salto exitoso desde un sitio a otro sitio, lo realiza sobremontando una barrera de energía libre (Hille y Schwarz, 1978). Este enfoque llamado de barreras de energía, tiene dos ventajas sustanciales:

- 1) La referencia a las estructuras químicas involucradas en la interacción del ión, con dominios específicos del canal, son simplemente descritas como variaciones de la energía libre en el lugar donde ocurre la interacción.
- 2) Cada vez que un ion ocupa un sitio diferente dentro del canal, es caracterizado como un cambio de estado (estado de ocupación del canal).

Estas suposiciones, permiten describir el proceso de conducción de iones en un régimen estacionario, como cambios de estados del canal y la transición entre los diferentes estados conductores posibles de un canal, quedan descritos por constantes de rapidez de primer orden que conectan estos estados.

Aparte de tomar una muestra de la magnitud del flujo de iones, el registro de la actividad de un canal único, permite tomar una muestra estadística de la duración que un canal iónico permanece en el estado conductor, como también el tiempo que permanece en el estado que no conduce iones. El proceso de abertura y cierre de un canal caracterizado por las fluctuaciones entre ambos estados, depende de la magnitud

y especificidad del estímulo. Cuando éste no varía en el tiempo, se ha demostrado que la cinética de apertura y cierre es un proceso al azar.

Suponiendo que los estados abierto y cerrado de un canal, corresponden a dos configuraciones distintas de la proteína, cada estado del canal puede ser descrito como la residencia de una "compuerta" en un mínimo de energía libre local, del conjunto de estados configuracionales posibles de un canal iónico que llevan a ambos estados observables. Entonces, la transición entre ambos estados puede ser descrita por constantes de rapidez de primer orden que conectan ambos estados. Como se mencionó anteriormente, la cinética de apertura y cierre de un canal es un proceso al azar, siendo el tiempo de residencia en uno u otro estado, una variable aleatoria. Al hacer una distribución estadística de los tiempos de residencia en un estado particular, es decir al hacer un histograma del número de veces (eventos) que el canal permaneció un determinado tiempo ($t_0 \leq t \leq t_0 + \delta t$) en un estado, se ha demostrado experimentalmente que el número de eventos disminuye, en la medida que se consideran en el histograma tiempos de residencia más largos. Esta distribución disminuye exponencialmente y queda caracterizada por el número de eventos y el tiempo de residencia promedio tau (la vida media en ese estado). Si la energía libre del estado cerrado, es menor que la del estado abierto, entonces

se puede decir que esa configuración es más estable y la vida media tau del estado cerrado, será mayor que la vida media tau del estado abierto. Si el número de veces que el canal transita al estado abierto aumenta, entonces el tiempo promedio tau de residencia en el estado cerrado disminuye. Esto, dicho de otra manera significa que la rapidez de la transición desde cerrado hacia abierto aumenta. Formalmente se ha demostrado que en el caso de un estado cerrado y un estado abierto, la constante de rapidez para la transición desde el estado cerrado al estado abierto, en un régimen estacionario, es exactamente el inverso del tiempo promedio de residencia en el estado cerrado. Lo mismo es cierto para el proceso inverso (Colquhoun y Hawkes, 1983).

La característica del modelo para la conducción de iones, como también del modelo para la cinética de abertura y cierre, es que un canal puede tener diferentes estados, donde cada estado representa un mínimo local de la energía libre y la transición entre estados diferentes, queda definido por un conjunto de constantes de rapidez que conectan estos estados.

1.2.- Un canal iónico visto como un sistema termodinámico.

Los modelos cinéticos como son los mencionados anteriormente, son hipótesis acerca de un mecanismo de funcionamiento de los procesos de conducción y de la cinética de abertura y cierre. Para un canal iónico en particular, estos procesos son dependientes de un conjunto de variables. Por ejemplo la concentración de iones, el potencial de membrana, la concentración de un agonista, la composición de lípidos de la membrana, etc. Un modo independiente de fundamentar o modificar los modelos propuestos, es realizar un estudio termodinámico de un canal iónico pues como se mencionó, nos permite entender los estados de un sistema de modo independiente del mecanismo estudiado. Esta última aseveración, constituye el punto de partida de esta tesis.

El método de reconstitución en bicapas planas de lípidos, de canales iónicos provenientes de membranas biológicas, brinda la posibilidad de realizar este tipo de estudios, pues permite mantener bajo riguroso control la concentración de iones, el potencial transmembrana, la concentración de agonistas, la composición de lípidos de la membrana y, fundamentalmente, permite el estudio de una proteína única inserta en la bicapa de lípidos. Esta última condición experimental, es extraordinaria, pues no existe otra metodología que pueda brindar tal acceso al control de las condiciones experimentales para estudiar el

comportamiento de una proteína de membrana. La otra variable que puede ser controlada es la temperatura, y ésta es una variable termodinámica.

1.3.- El canal de potasio activado por calcio, ubicado en el túbulo transversal del músculo esquelético, como modelo experimental.

El canal de potasio activado por calcio, es un canal muy selectivo para el ion potasio y el proceso de conducción de este ion es muy eficiente (230 pS en 100 mM KCl), estando apenas por debajo de la difusión libre del potasio en solución (~ 300 pS (Hille, 1984)). El estímulo que estabiliza el estado conductor de iones, es la unión del ion calcio a la proteína. Este estímulo, sólo es efectivo en un polo del canal el cual es definido como el lado intracelular. La estabilidad del estado conductor, a un potencial eléctrico constante, es una función de la concentración de calcio. Por otro lado a una concentración de calcio constante, la estabilidad del estado conductor vista como la fracción de tiempo que el canal permanece abierto, aumenta al aplicar potenciales despolarizantes con respecto al lado sensible al calcio. Esta curva de activación, se desplaza hacia valores negativos del eje de potencial, al aumentar la concentración de calcio.

1.4.- El proceso de abertura y cierre en el canal de K^+ activado por calcio.

Con el propósito de elaborar un modelo para la cinética de abertura y cierre, considerando su dependencia por el ion calcio y el potencial, Moczydlowski y Latorre (1983), demuestran dos hechos de singular importancia :

- 1) Las constantes cinéticas asociadas al cambio de configuración de abertura y cierre del canal, no dependen del potencial eléctrico.
- 2) La unión de calcio a un sitio en un dominio regulador de la proteína, es dependiente del potencial eléctrico.

Estos dos resultados tienen las siguientes consecuencias:

- 1) La transición entre los estados abierto y cerrado, no ocurre por movimiento de "partículas cargadas", como es el caso común de aquellos canales dependientes únicamente de potencial.
- 2) Es posible separar (al menos conceptualmente) dos dominios distintos en la proteína, un dominio receptor de calcio, y un dominio de la cinética de apertura y cierre del canal.
- 3) La unión de calcio al canal, es dependiente del potencial aplicado indicando que los sitios de unión a éste, se encuentran en una región en el interior de la proteína.

1.5.- El proceso de conducción de iones en el canal de K^+ activado por calcio.

Con el propósito de entender como es el proceso de conducción iónica, en este canal muy selectivo para potasio y de gran capacidad de transporte, Eisenman (Eisenman et al, 1986) estudiaron este proceso evaluando la conductancia en función de la concentración de análogos del ion potasio (v.gr. amonio, rubidio) y también realizaron experimentos de competencia entre el ion potasio y estos análogos. La demostración más notable de estos experimentos de competencia, es que la curva de la conductancia del canal, en función de la fracción molar del análogo (que es conducido menos eficientemente), no disminuye monótonamente al aumentar la fracción molar de este último, sino que existe un mínimo para el valor de la conductancia, a una fracción molar particular del análogo. Este fenómeno, denominado efecto anómalo de la fracción molar (Hille, 1984), sugirió que durante el proceso de conducción, los iones interactúan entre sí. Dicho de otro modo, el canal puede acoger en su vía de conducción, mas de un ion simultáneamente. Villarroel, en su tesis de Doctorado (Villarroel, 1989), modela el proceso de conducción utilizando un modelo de barreras de energía libre. El elaboró un modelo particular que tiene tres barreras y dos pozos (sitios de residencia de un ion), permitiendo que los dos sitios puedan ser ocupados simultáneamente. La

interacción entre iones la modeló como una simple repulsión electrostática. Un refinamiento posterior, el cual le permitió describir la conducción iónica a concentraciones muy bajas de potasio, consistió en suponer que en cada entrada de la vía de conducción existe una distribución de cargas negativas.

Este canal ha sido sujeto a una intensa investigación (Vergara y Latorre, 1983; Villarroel, 1986; Cecchi y cols. 1986 y 1987; Oberhauser, 1987; Alcayaga, 1987), donde la caracterización de ambos procesos es bastante detallada. Es por estas razones, que en el presente trabajo se ha escogido al canal de potasio activado por calcio como un excelente modelo experimental para realizar este estudio termodinámico.

El aporte de esta tesis, es el estudio de las propiedades antes descritas, utilizando como una nueva variable independiente, los cambios de temperatura. Es decir, aprender cómo es el comportamiento del canal al modificar la energía interna de esta macromolécula.

2.- METODOS

El trabajo realizado en esta tesis, se puede dividir en tres etapas:

- 1) Incorporación del canal de K^+ activado por Ca^{2+} en la bicapa de lípidos.
- 2) Experimentos de variación de la temperatura.
- 3) Análisis de la actividad del canal de K^+ activado por Ca^{2+} al variar la temperatura.

2.1.- Incorporación del canal de K^+ activado por Ca^{2+} en la bicapa de lípidos.

2.1.1.- Purificación de vesículas del túbulo transversal.

El método utilizado, es una modificación de aquel reportado por Roseblatt y colaboradores(1981).

2.1.1.1.- Etapa preparativa.

Los músculos de las patas de 4 ratas fueron disecados, eliminando tejido adiposo y conectivo. Posteriormente se desmenuzó con una picadora de carne (Moulinex). A través de todo el procedimiento, se usó una solución tampón base de la siguiente composición : Tris-Maleato 20 mM a pH 7,0 (Sigma Chem), a la cual se agregó, dependiendo de la etapa del proceso diferentes solutos según se especifica. Aproximadamente 100 gramos de tejido, fueron suspendidos en 400 ml de la solución base que además contenía KCl 100 mM

(p.a. Merck) y los siguientes inhibidores de proteasas : benzamidina 400 μ M (Fluka), pepstatina 1 μ g/ml (Fluka), leupeptina 1 μ g/ml (Fluka), Fluoruro de Fenil-Metil-Sulfonilo (PMSF, Sigma Chem) 100 μ M. Se homogeneizó en una juguera (Warren Blendor) a bajas revoluciones por 30 segundos y luego por 15 segundos a altas revoluciones. Con el propósito de eliminar restos de tejido y material no deseado, el homogeneizado fue centrifugado en una centrifuga Sorvall (modelo RC2-B) con un rotor GSA, por 30 minutos a 8.000 rpm. El sobrenadante fue separado y el sedimento fue resuspendido en la misma solución inicial y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones previas. Terminada esta centrifugación, ambos sobrenadantes fueron reunidos y se agregó KCl sólido, hasta una concentración final de 600 mM. Este aumento en la fuerza iónica, tiene como propósito solubilizar las proteínas asociadas con la contracción muscular.

El sobrenadante fue centrifugado por 1 hora a 29.000 rpm en una ultracentrífuga Beckmann (modelo L) con un rotor 30. Las membranas sedimentadas fueron resuspendidas en la solución de base para eliminar proteínas solubles y KCl, siendo nuevamente centrifugadas en las mismas condiciones anteriores.

2.1.1.2.- Etapa analítica.

Un volumen de membranas fue resuspendido suavemente con un homogeneizador vidrio-vidrio, agregando lentamente 3 volúmenes de la solución base que, además, contenía sacarosa 300 mM (p.a.Merck). Estas fueron depositadas encima de un tubo que contenía en orden ascendente, los siguientes volúmenes de una solución de sacarosa disuelta en la solución base : 9 ml sacarosa 37 % (p/v), 10 ml sacarosa 27,5 % (p/v), 10 ml sacarosa 25 % (p/v). Las membranas fueron centrifugadas por 12 horas en un rotor SW 25 a 22.000 rpm en una ultracentrífuga Beckmann modelo L.

De las fracciones de membranas separadas por esta centrifugación en gradiente discontinua, se colectó cuidadosamente la fracción que se depositó en la interface 25% - 27,5% (p/v) de sacarosa. Esta fracción corresponde a vesículas del túbulo transversal del sistema de membranas del retículo sarcoplásmico. Estas vesículas fueron resuspendidas en la solución base y sedimentadas por centrifugación a 29.000 rpm en un rotor 30. Un volumen de las membranas concentradas fue homogeneizado y resuspendido cuidadosamente con un homogeneizador vidrio-teflón en 2 volúmenes de solución de base.

En un baño de hielo carbónico y acetona, se congelaron abruptamente alícuotas de 30 μ l, siendo almacenadas hasta su uso posterior a -80 °C.

La concentración de proteínas se determinó usando el método de Lowry y fue en promedio 1 mg/ml.

El procedimiento de preparación de las vesículas, se realizó a una temperatura de 0 - 4 °C.

2.1.2.- La cámara de reconstitución y control de la temperatura.

En un bloque de cloruro de polivinilo se perforaron dos cilindros de 2 cm de diámetro, los cuales se intersectan por uno de sus lados. Las paredes del bloque fueron labradas hasta dejarlas de un espesor de 2 mm. A un lado de cada cavidad se perforó un cilindro de 0,5 cm de diámetro, cuya función fue hacer de receptáculo de los electrodos. Al momento de cada experimento la cámara fue ubicada en un bloque de bronce, por cuyo interior se hizo circular agua a diferentes temperaturas. El diseño del bloque y la cámara permitió que la superficie de intercambio de calor entre el agua y la solución dentro de la cámara fuera buena para el propósito de enfriar la solución de la cámara.

Con el propósito ulterior de agitar la solución de ambos compartimentos, se ubicaron dos imanes bajo el bloque separados entre sí por 2 cm., éstos se hacían girar con un motor eléctrico pequeño.

2.1.3.- El soporte de la bicapa artificial de fosfolípidos.

Antes de cada experimento, se ubicó entre las cavidades mayores una película de teflón de 17 μ m de espesor, la cual

tenía una perforación hecha con un sacabocado de aproximadamente 350 μm de diámetro. El perímetro de esta perforación fue pulido haciendo pasar un arco voltaico. Esta película, hizo de soporte de la bicapa de lípidos y además permitió aislar eléctricamente ambos compartimentos, al momento de formarse la bicapa.

2.1.4.- Electroodos reversibles de Ag / AgCl.

Dos trozos de 5 centímetros de largo y 0,8 mm de diámetro, de alambre de plata, fueron pulidos con una lija fina y limpiados con cloroformo. Uno de los extremos de cada alambre fue enrollado como hélice y se limpió nuevamente. Las hélices de ambos alambres fueron sumergidas en una solución de HCl 100 mM. Estos hicieron de ánodo, por donde se hizo circular una corriente positiva de 10 mA por 10 minutos, el cátodo fue un alambre de platino. Así fueron elaborados 2 electroodos reversibles y similares de plata/cloruro de plata.

2.1.5.- Estimulación de la bicapa y registro de la actividad eléctrica del canal.

La esencia de los experimentos aquí descritos consiste en crear una diferencia de potencial eléctrico entre ambos compartimentos de la cámara de reconstitución y simultáneamente registrar el flujo de iones inducidos por este estímulo. La descripción y funcionamiento del sistema de registro de canales únicos, es fundamentalmente el descrito en Alvarez y colaboradores (1985).

En la figura 1, se muestra un diagrama de flujo de la información contenida en un experimento.

El módulo a (ver figura 1), corresponde a un estimulador de dos modalidades. En una modalidad, aplica reiteradas veces vía un electrodo, un pulso de +5 mV de amplitud y 1 milisegundo de duración. Su función es verificar y calibrar la formación y tamaño de la bicapa de fosfolípidos respectivamente.

En el otro modo de funcionamiento, aplica un nivel de potencial constante cuya magnitud y duración son determinados por el experimentador. El intervalo de potenciales posibles es de -100 mV hasta 100 mV.

El estímulo, es aplicado en un compartimento definido como lado cis, y la magnitud y polaridad, son relacionados a un potencial de referencia o tierra virtual.

El módulo b es un ingenio cuya tarea consiste en convertir la corriente que pasa a través de la membrana en un voltaje, cuya magnitud y la polaridad es proporcional a un factor de calibración.

El diseño de este conversor corriente-voltaje, está basado en un amplificador operacional de bajo ruido y gran rapidez de respuesta (OPA 101, Burr Brown). En esta configuración la entrada inversora, está conectada directamente al electrodo reversible y la otra entrada está conectada al potencial de referencia del sistema. Esta

configuración determina que el compartimento conectado al conversor de corriente a voltaje, definido como trans, esté permanentemente al potencial de tierra virtual.

La corriente originada en trans fluye por el electrodo reversible y circula a través de una resistencia de retroalimentación (R_f) de 10^8 ohm, generando a la salida del amplificador un potencial $V_s = - I_{\text{canal}} \times R_f$.

Con el propósito de evitar interferencias eléctricas espúreas, la cámara de reconstitución y el conversor corriente-voltaje están en el interior de una jaula de Faraday de aluminio. La fuente de alimentación eléctrica fueron dos baterías de 6 volts, de 2 Amperes/hora.

El módulo c, recoge la señal originada por el conversor corriente-voltaje y añade una etapa de amplificación de 3 ganancias seleccionables de 1 mV/pA, 10 mV/pA, 100 mV/pA respectivamente.

Un efecto no deseado de la conversión de corriente a voltaje es la disminución del tiempo de respuesta, originado por un elemento capacitivo intrínseco de la resistencia de retroalimentación. Esta situación puede ser mejorada usando un circuito compensador de frecuencias, cuya propósito consiste en aplicar de manera analógica, la función matemática de la derivada a la señal proveniente de las etapas anteriores. La forma de esta derivada es la de una exponencial, la cual es sumada a la señal original. Esta

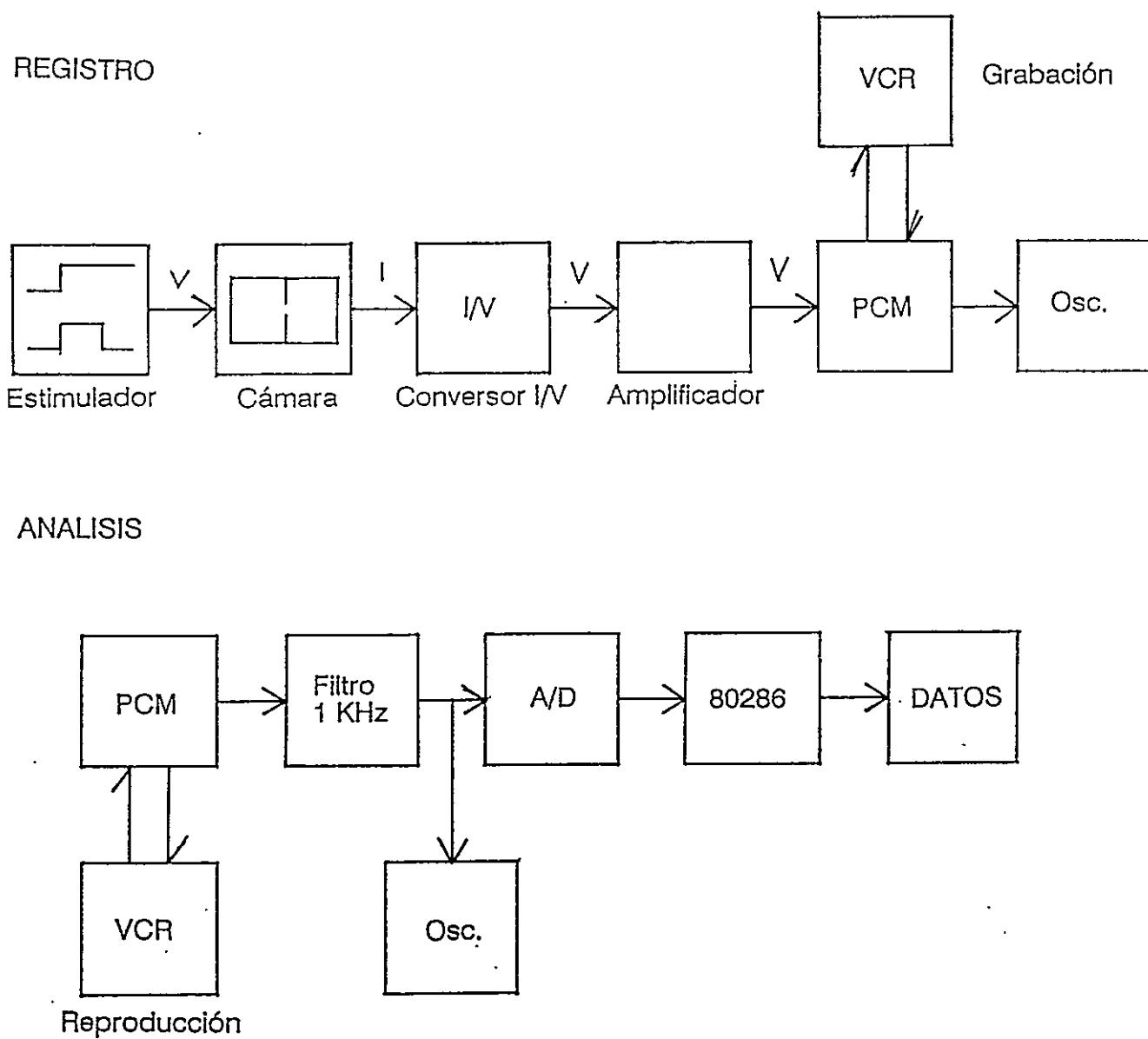
operación tiene por efecto aumentar la resolución temporal de la señal obtenida.

El módulo d, tiene por función almacenar en un medio magnético, la señal amplificada y corregida. Esto se realiza usando el método de modulación de pulso codificado (PCM), que significa codificar un valor de voltaje análogo en un número binario y este último modularlo en frecuencia (FM). Este proceso fue realizado con un procesador de audio Technics (modelo SV-100) el cual tiene una frecuencia de muestreo de 44 kHz, con una resolución de 14 bits. El procesador de audio fue modificado por el Dr. Osvaldo Alvarez y el señor Juan Espinoza, con el propósito de obtener un intervalo de respuesta desde DC hasta 20 kHz. La señal así transformada, es almacenada en una cinta por una grabadora de video Panasonic (modelo NV-G18PX) hasta el momento de análisis.

Simultáneamente a esta operación, la actividad eléctrica es visualizada en un osciloscopio.

Figura 1.

Diagrama de flujos de la obtención de datos.



2.1.6.- La formación de la bicapa de fosfolípidos.

En cada experimento, se utilizó fosfatidiletanolamina (PE) de cerebro de bovino (Avanti Polar Lipids). Típicamente, desde un stock de 25 mg/ml de PE en cloroformo, se tomó una alícuota de 20 μ l, a la cual se le evaporó el solvente bajo una corriente suave de nitrógeno, en un frasco cónico. Una vez evaporado el cloroformo, se agregó 40 μ l de n-decano como solvente. La concentración final fue de 12,5 mg/ml.

Antes de cada experimento, la película de teflón fue montada entre los compartimentos de la cámara, adheriendo la película a la cámara con silicona. La perforación de ésta fue pintada con los fosfolípidos y el solvente fue evaporado.

Al momento del experimento, ambos compartimentos fueron llenados con una solución de MOPS-KOH 10 mM a pH 7,2. Cada receptáculo de electrodo fue llenado con KCl 3 M y los electrodos fueron puestos en éstos. Cada compartimento fue unido eléctricamente con un puente de agar hecho con una micropipeta de 100 μ l, la cual estaba llena con agar 2% (p/v) en KCl 3 M. Luego se procedió a "pintar" la abertura en el teflón, con una varilla de vidrio mojada en los fosfolípidos. Usando el estimulador en la modalidad de pulso y con el amplificador con ganancia 1 mV/pA, se procedió a estimular la bicapa. El éxito de este procedimiento, se visualizó como una disminución abrupta del potencial hasta el nivel de

referencia. La formación de la bicapa se visualizó como un aumento paulatino del tamaño de la respuesta de la bicapa al pulso de voltaje (es decir la carga y descarga de un condensador). Se consideró que la bicapa estaba formada por comparación con la respuesta de un condensador de 250 pF. Si la bicapa permanecía estable, vale decir no aumentaba ni disminuía de tamaño por al menos 5 minutos, entonces se procedía con el experimento.

2.1.7.- Protocolo de fusión de las vesículas del túbulo transversal.

Una vez formada la bicapa, se agregó al compartimento cis un volumen de KCl 3 M necesario para tener una concentración final de KCl 100 mM. La misma operación se realizó para tener una concentración de CaCl₂ de 30 μM. La adición sistemática de calcio al lado cis, se debe a que generalmente el dominio de regulación por calcio, queda orientado hacia este compartimento. Este fenómeno ocurre porque un gran porcentaje de la población de vesículas se sella con la misma orientación, es decir el dominio regulador está orientado hacia el interior de la vesícula.

En estas condiciones de gradiente osmótica, se agregó 5 μl de la preparación de vesículas, se agitó la solución, haciendo girar en cada compartimento, una barra imantada cubierta de teflón.

La incorporación de un canal en la bicapa, se visualizó como una aparición de fluctuaciones de la señal entre dos niveles discretos de potencial. Después de algunos momentos de verificación de la estabilidad de la incorporación del canal, se añadió al compartimento trans KCl 3 M necesario para tener una concentración final de KCl 100 mM.

2.2.- Experimentos de variación de la temperatura.

2.2.1.- Cambios de la temperatura.

Esencialmente, estos experimentos consistieron en realizar un procedimiento experimental a 3 temperaturas: 25°C, 15°C, y una temperatura intermedia entre 10 y 5 °C. La temperatura de 25°C, se obtuvo haciendo circular agua a esa temperatura. Para bajar la temperatura a 15 grados, se hizo circular agua a 10 grados, mientras se mantenía un registro de la temperatura en el compartimento cis de la cámara experimental hasta que ésta alcanzara 15°C. Una vez alcanzada esta temperatura se hizo circular agua previamente temperada a 15°C. La temperatura requerida se obtuvo en un lapso de 8 minutos aproximadamente. Para obtener una temperatura menor de 10°C se hizo circular agua a 0°C, hasta alcanzar una temperatura entre 10 y 5 °C. No siempre fue posible una temperatura menor a 5°C, generalmente una temperatura de 7°C, fue posible de obtener después de 15 a 20 minutos de hacer circular agua. Una vez alcanzada la temperatura, se procedió a registrar un segmento de experimento, después del cual se verificó la temperatura con un teletermómetro YSI (modelo 43TD con una termocupla YSI 400, el error de la medida fue de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). En contadas ocasiones, fue posible verificar una deriva de la temperatura de alrededor de 1 a 2 °C, si así sucedió, se descartó ese registro y se repitió el segmento experimental. Después de cada registro, se hizo circular agua

nuevamente, agitando la solución de ambos compartimentos y verificando la temperatura.

También se observó que el pH de la solución varió desde 7,2 a 25 °C hasta 7,0 a 5 °C. No se intentó corregir este cambio, dado que el efecto de pH sobre este canal, se verifica a cambios mucho mayores que 0,2 unidades de pH (Laurido, 1990).

2.2.2.- Experimentos de conductancia.

En estos experimentos se colectó la actividad del canal a diferentes potenciales desde un rango de -60 mV hasta +60 mV. En los experimentos reportados, sólo se estudia la propiedad de conducción iónica en una solución de KCl 100 mM, por considerar que es la situación experimental más simple para evaluar el modelo de conducción iónica considerado.

2.2.3.- Experimentos de activación por calcio y por potencial.

En estos experimentos, se hicieron largos registros (3 a 6 minutos) de la actividad del canal a diferentes potenciales, en un rango de -60 a +60 mV, a una concentración fija de calcio (usualmente 30 μM ó 100 μM).

2.2.4.- Experimentos del efecto de la concentración de calcio sobre la cinética de abertura y cierre.

Estos experimentos se realizaron a un potencial constante de +40 mV variando la concentración de calcio, desde 20 μM hasta 120 μM . Se tomaron largos registros, con el

propósito de realizar el análisis con 2000 o más transiciones.

2.3.- Análisis de la actividad del canal de K⁺ activado por Ca²⁺ a diferentes temperaturas.

2.3.1.- Muestreo de los datos.

El registro de la actividad del canal de K⁺ activado por Ca²⁺, fue transferido a un computador como lo indica la figura 1. La señal fue transferida a un filtro pasa bajas de respuesta de Bessel de 8 polos (Frequency Devices, modelo 902) a una frecuencia de corte nominal de 1 kHz. La señal filtrada fue tomada por un conversor análogo-digital, el cual muestreó a una frecuencia de 10 kHz. Estos valores fueron transferidos a la memoria de acceso directo de un computador basado en la cpu 80286, y escritos secuencialmente en un medio magnético. Este procedimiento, fue realizado con un programa creado por el Dr. Osvaldo Alvarez.

2.3.2.- Tabulación de los datos.

Un registro de canal único, proporciona dos tipos de datos: la magnitud de la fluctuación de corriente, entre el estado abierto y el estado cerrado y una secuencia del tiempo de residencia en cada estado.

Se usó un programa que permitió visualizar un registro particular, y dados unos parámetros de calibración, permitió obtener estos datos.

2.3.3.- Relación corriente vs. potencial y cálculo de la conductancia.

De un registro de actividad a un potencial dado, se escogió un segmento de 1 segundo de actividad y se construyó un histograma de amplitudes de corriente. Se tomó el promedio de cada distribución (abierto y cerrado) y la diferencia entre estos promedios, se consideró como la corriente unitaria a ese potencial. Se repitió este procedimiento para cada potencial de un experimento, obteniéndose así la relación I vs. V . La conductancia fue calculada como la pendiente de una regresión lineal a los puntos experimentales.

2.3.4.- Secuencia de tiempos de residencia en el estado cerrado y el estado abierto.

Para tomar este tipo de datos fue necesario utilizar un criterio para determinar cuando un canal está en el estado abierto o en el estado cerrado. Un criterio válido, el umbral, es considerar que un canal cambia de estado cuando el valor de la fluctuación de corriente, alcanza la mitad del valor de la corriente unitaria. Así, tomando como punto de partida un estado abierto y utilizando un algoritmo de búsqueda de transiciones, se evaluó cada punto consecutivo ($100 \mu s$), hasta que el valor de corriente llegaba al umbral. Cuando esto ocurrió, se sumó el tiempo total en ese estado, se dió por terminada la residencia del canal en ese estado y

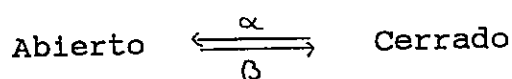
el proceso se repitió para el estado siguiente. De este modo se construyó un archivo secuencial de la duración de eventos de abertura y cierre del canal.

2.3.5.- Delimitación de la ventana temporal de observación.

En esta tesis, por simplicidad, se escoge observar todos los estados cinéticos del canal asociados a la abertura y cierre, que duren al menos un milisegundo. Para ello, fue necesario reelaborar cada uno de los archivos con la secuencia de eventos, haciendo una corrección de la duración de cada uno de los tiempos de residencia debida a la eliminación de aquellos eventos menores que un milisegundo. Así, el nuevo archivo contiene la secuencia de eventos corregidos.

2.3.6.- Estimación del tiempo promedio abierto y tiempo promedio cerrado, suponiendo que el canal tiene dos estados de conductancia.

El modelo más simple para la cinética de abertura y cierre, es suponer que el canal, tiene un estado abierto y un estado cerrado, donde la transición entre estados, queda descrita por el siguiente esquema cinético :



donde ambas constantes cinéticas son dependientes de potencial.

El registro de la actividad del canal, es una lista de n elementos, donde cada elemento del estado abierto (o cerrado) i , tiene una duración t_{ai} (o t_{ci}). El tiempo promedio en cada estado se calculó como sigue :

$$\tau_o = \frac{\sum t_{oi}}{n} \quad (1)$$

La probabilidad de abertura P_o , fue estimada de la siguiente manera :

$$P_o = \frac{\tau_a}{\tau_a + \tau_c} \quad (2)$$

2.3.7.- Curva de probabilidad de abertura.

La fracción de tiempo abierto en función del potencial fue ajustada con la expresión siguiente :

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp[-nF(V-V_{0,5})/RT]} \quad (3)$$

donde n , es el número de partículas eléctricas cargadas que se mueven durante la transición cerrado a abierto, y $V_{0,5}$ es el potencial al cual $P_o = 0,5$, son los parámetros ajustables que describen la curva.

2.3.8.- Distinción de los estados cinéticos del canal.

Como criterio de distinción de los estados cinéticos del canal se supuso que cada componente cinético, tiene una distribución exponencial de los tiempos de residencia. Por lo tanto para visualizar y calcular los parámetros que describen esta distribución (área bajo la curva y tiempo promedio), se construyeron histogramas del número de eventos con duración $t_0 \leq t < t_0 + \delta t$, donde δ tiene una progresión logarítmica (Sigworth y Sine, 1987). Cada histograma, fue ajustado usando un algoritmo de búsqueda de parámetros que ajusta una función de densidad de la probabilidad compuesta por la suma de una o varias distribuciones exponenciales. El criterio utilizado para el ajuste a las distribuciones experimentales construídas, fue la maximización del logaritmo de la función de verosimilitud. El programa que se usó fue desarrollado por el Dr. Osvaldo Alvarez.

2.3.9.- Estimación de los cambios de entalpía y entropía de activación.

La conductancia y las constantes de rapidez que caracterizan a los estados cinéticos del canal, en función de la temperatura, fueron ajustados a la ecuación de Eyring. Esta ecuación relaciona a una constante cinética para la transición entre un estado j y un estado i , con los cambios de entropía y entalpía del estado de transición. La expresión utilizada para ajustar los datos a diferentes temperaturas

fue la ecuación de Eyring en una forma lineal :

$$\text{Ln } k_{ij} = \text{Ln} \frac{k_B T}{h} + \frac{\Delta S_{\text{act}}}{R} - \frac{\Delta H_{\text{act}}}{RT} \quad (4)$$

Se grafica el logaritmo de la constante cinética vs. el inverso de la temperatura, la gráfica resultante es una gráfica de Arrhenius. Esta representación de los datos nos permite obtener una estimación de los cambios de la entropía y la entalpía de activación, dado un conjunto de constantes de rapidez experimentales estimadas a diferentes temperaturas. El valor estimado de los parámetros se realizó haciendo un ajuste a esta ecuación, usando un programa de ajuste no lineal (NFIT).

3.- RESULTADOS

3.1.- Efecto de la temperatura en el proceso de abertura y cierre en el canal de K⁺ activado por Ca²⁺.

En la figura 2, se muestran registros típicos de la actividad del canal de K⁺ activado por Ca²⁺ obtenidos a un potencial de +40 milivolts a tres temperaturas diferentes y a una concentración de calcio de 20 μM (a) y 80 μM (b). A 20 μM calcio, es posible observar que en la medida que la temperatura disminuye, el tiempo de residencia en el estado cerrado aumenta considerablemente. Por otra parte el tiempo de residencia en el estado abierto sólo es afectado ligeramente, mostrando semejanzas a 7°C y 15°C. También es posible observar que el número de eventos de abertura o cierre, decrece notablemente con la disminución de la temperatura. La presencia de eventos de muy corta duración, es bastante menor que aquella a 25°C. Otra característica recurrente en una buena parte de los experimentos realizados, es la observación de cambios abruptos de ritmo del proceso de abertura y cierre. Un ejemplo ilustrativo, es aquel indicado por las flechas en el registro a 25 °C. Este fenómeno ha sido observado a diferentes temperaturas.

Una observación hecha en este canal (Vergara y Latorre, 1983; Oberhauser, 1987; Laurido, 1989), es que al aumentar la concentración de calcio en el lado regulador, el tiempo de

permanencia en el estado abierto aumenta. De acuerdo con estas observaciones, una comparación del registro a una concentración de calcio de $20 \mu\text{M}$ con el obtenido a $80 \mu\text{M}$ a 25°C , muestra que la duración del estado abierto aumenta y la duración del estado cerrado disminuye.

Al considerar el comportamiento del canal en $80 \mu\text{M}$ de calcio y a las diferentes temperaturas, es aparente que los tiempos de residencia del canal en el estado cerrado y en el estado abierto son más prolongados en la medida que la temperatura disminuye. Además, el canal a 7°C y 15°C presenta el mismo patrón de comportamiento que a 25°C , vale decir a $+40 \text{ mV}$ la duración del estado abierto es consistentemente mayor que la duración de los estados cerrados.

Por último, debe notarse que la magnitud de la corriente unitaria, decrece al disminuir la temperatura, fenómeno tratado en la sección sobre el proceso de conducción iones.

Figura 2.

Efecto de la temperatura sobre la cinética de abertura y cierre del canal de K^+ activado por Ca^{2+} .

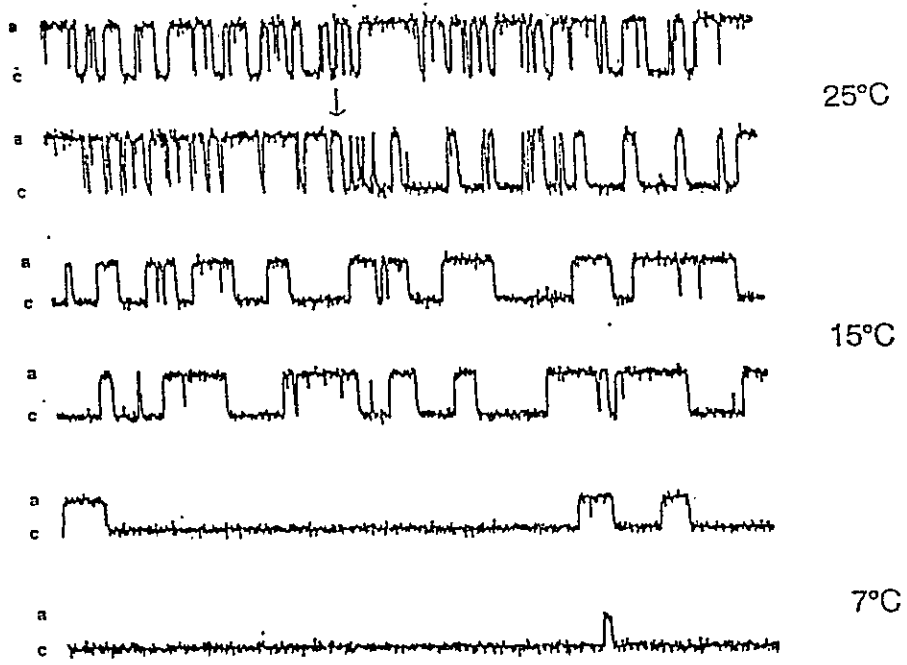
Estos son registros de corriente de un mismo canal de K^+ activado por Ca^{2+} incorporado en una membrana de PE (12,5 mg/ml) en donde la composición de la solución en el lado cis y trans fue la siguiente: KCl 100 mM, MOPS-KOH 10 mM a un pH de 7,2. El potencial transmembrana aplicado fue de +40 mV durante todo el experimento. Estos registros fueron filtrados a 1 kHz, con un filtro pasabajos de respuesta de Bessel de 8 polos y pasados a un computador a una frecuencia de muestreo de 10 kHz.

El rótulo a indica el estado conductor y el rótulo c el estado no conductor de iones.

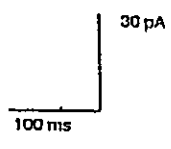
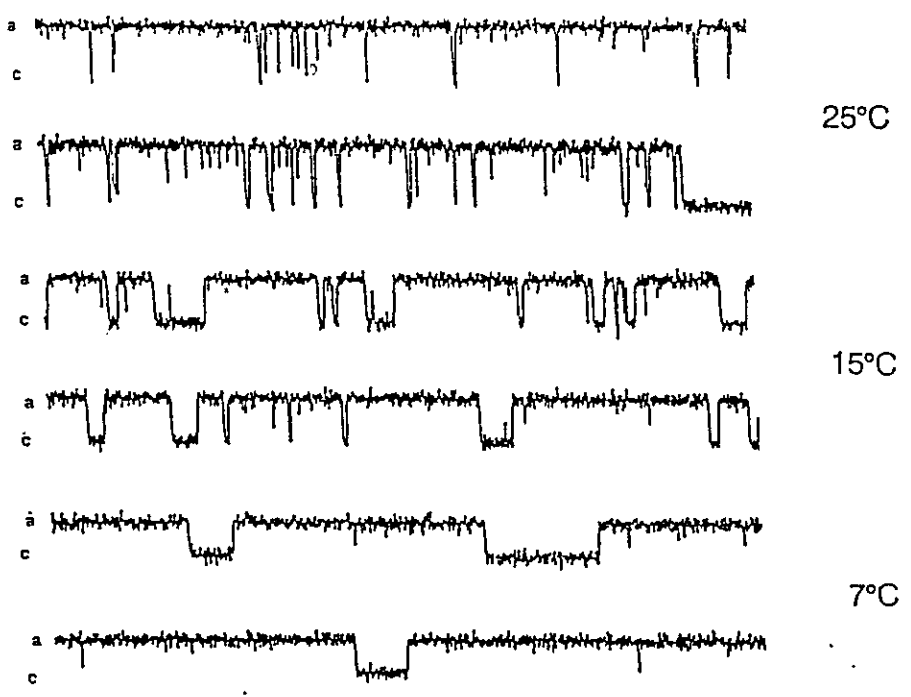
a.- Registro de 1,6 segundos de la actividad del canal a una concentración de calcio de 20 μ M y a tres temperaturas, como se indica. Las flechas indican el momento de los cambios de ritmo de la cinética de abertura y cierre.

b.- Registro en las mismas condiciones que el anterior, pero a una concentración de calcio de 80 μ M.

a.-



b.-



3.1.1.- Activación por potencial.

A la temperatura ambiente (21-23 °C), la fracción de tiempo abierto en el canal de K^+ activado por Ca^{2+} es una función sigmoídea del potencial. La figura 3 muestra dos experimentos donde se examina la activación por potencial a diferentes temperaturas y a una concentración de calcio de 30 μM . La tabla I, muestra el valor de los parámetros obtenidos al ajustar una distribución de Boltzmann, como se describió en métodos (líneas continuas en la figura 3).

Una simple inspección de las curvas, indica un hecho ya mencionado en otros trabajos (Oberhauser, 1987), esto es, el canal de K^+ activado por Ca^{2+} es heterogéneo con respecto a su sensibilidad al calcio. A una misma concentración de calcio y a todas las temperaturas estudiadas la diferencia en el valor de $V_{0,5}$ varía entre 10 mV (15°C) y 18 mV (25°C).

El rasgo más aparente al disminuir la temperatura es un desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales más positivos. Esto significa que a baja temperatura, es necesario aplicar un potencial despolarizante mayor, para obtener un valor de P_0 comparable al obtenido a una temperatura superior.

Considerando nuevamente como criterio el valor de $V_{0,5}$, la magnitud de este desplazamiento en ambos canales, es de alrededor de 25 mV para una disminución desde 25°C a 10°C.

Sin embargo, al comparar en un mismo experimento el

efecto del potencial aplicado, sobre el número de partículas cargadas que se mueven durante la transición cerrado a abierto (el parámetro n de la distribución de Boltzmann), no se encuentra una diferencia que sea significativa, por lo tanto no se puede decidir si la temperatura tiene un efecto sobre este parámetro.

Figura 3.

Activación por potencial del canal de K^+ activado por Ca^{2+} .

En esta figura se muestran dos experimentos donde se graficó la fracción de tiempo abierto (P_o) vs. el potencial transmembrana a una concentración de calcio de $30 \mu M$. Para ello se calculó el tiempo promedio abierto y cerrado de registros de corriente a diferentes potenciales y temperaturas. La fracción de tiempo abierto a cada potencial se calculó usando la ecuación 2.

Los experimentos rotulados Sep 6 y Oct 5 fueron realizados en las mismas condiciones experimentales descritas en métodos. La secuencia de los cambios de temperatura fue 25-15-10 °C.

Calcio $30 \mu\text{M}$.

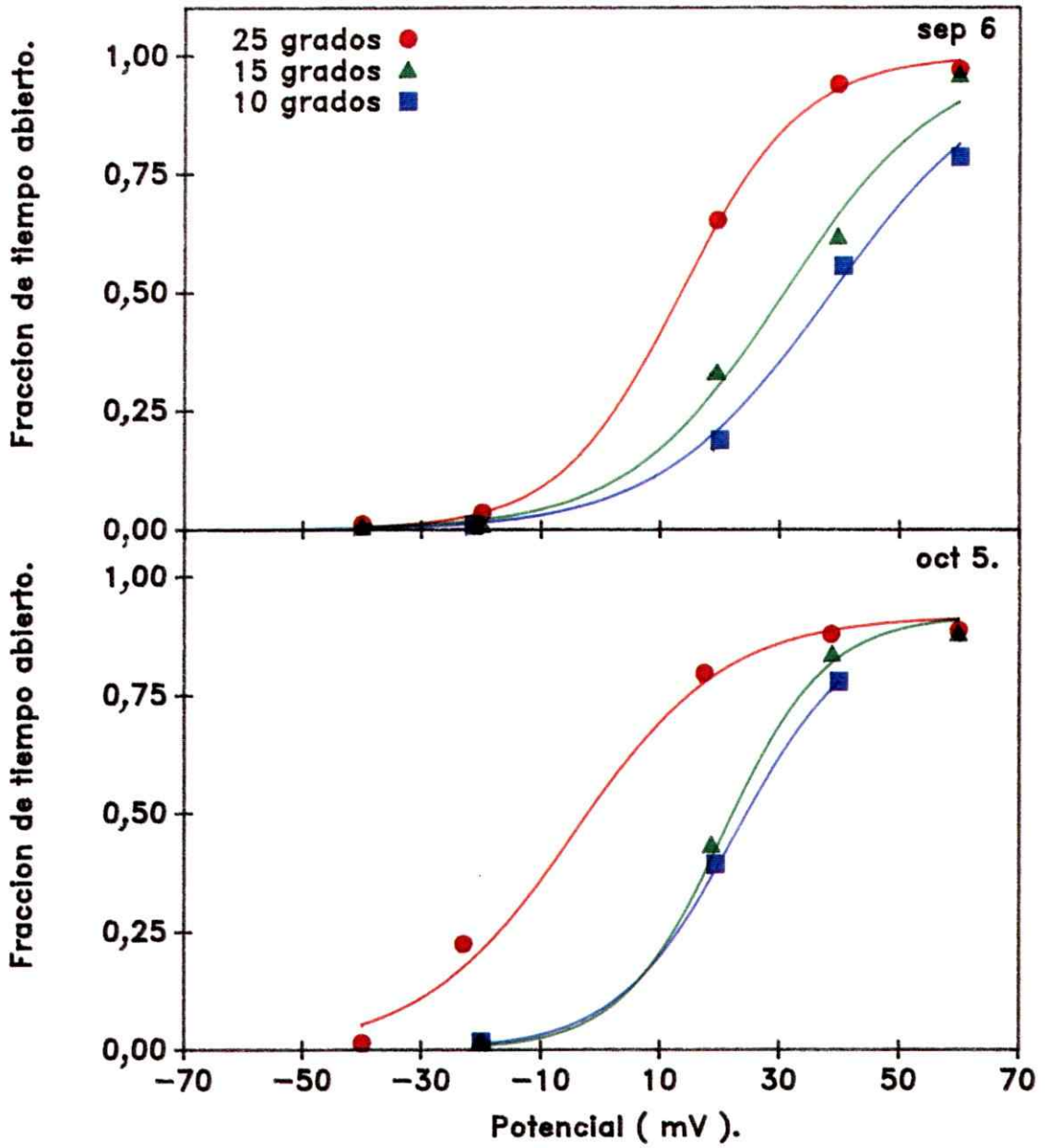


Tabla I.
Curva de activación.

Parámetros descriptores de una distribución de Boltzmann para un canal de 2 estados, a una concentración de calcio de 30 μM .

	Sep 6		Oct 5	
	$V_{0,5}$	n	$V_{0,5}$	n
25 °C	13,6	1,9	-4,3	1,5
15 °C	30,9	1,4	20,9	1,9
10 °C	38,7	1,3	22,9	2,1

3.1.2.- Efecto de la temperatura sobre los tiempos promedios abierto y cerrado.

La fracción de tiempo abierto, es un índice global del comportamiento de la cinética de abertura y cierre de un canal y se puede considerar como un balance ponderado entre el tiempo que permanece abierto y el tiempo que permanece cerrado.

Con el propósito de establecer un origen para el desplazamiento de las curvas de activación, se estudió el comportamiento del tiempo promedio abierto y el tiempo promedio cerrado. La figura 4, es una representación de esta evaluación en los experimentos que se describen en la figura 3. En primer lugar los tiempos promedios cerrados y abiertos, dependen de manera exponencial del potencial eléctrico (la ordenada es un eje logarítmico). Sin embargo, el rasgo más sobresaliente de este análisis es la observación de que el promedio del tiempo que el canal permanece abierto, es muy poco afectado por los cambios de temperatura (no hay un desplazamiento apreciable de las rectas entre sí). En cambio, el promedio del tiempo cerrado a todos los potenciales estudiados, aumenta según la temperatura disminuye (se aprecia un notable desplazamiento hacia tiempos promedios mayores). Esta observación sugiere que el origen del desplazamiento de las curvas de activación, ocurre por un efecto de la temperatura sobre el tiempo promedio que el

canal permanece cerrado.

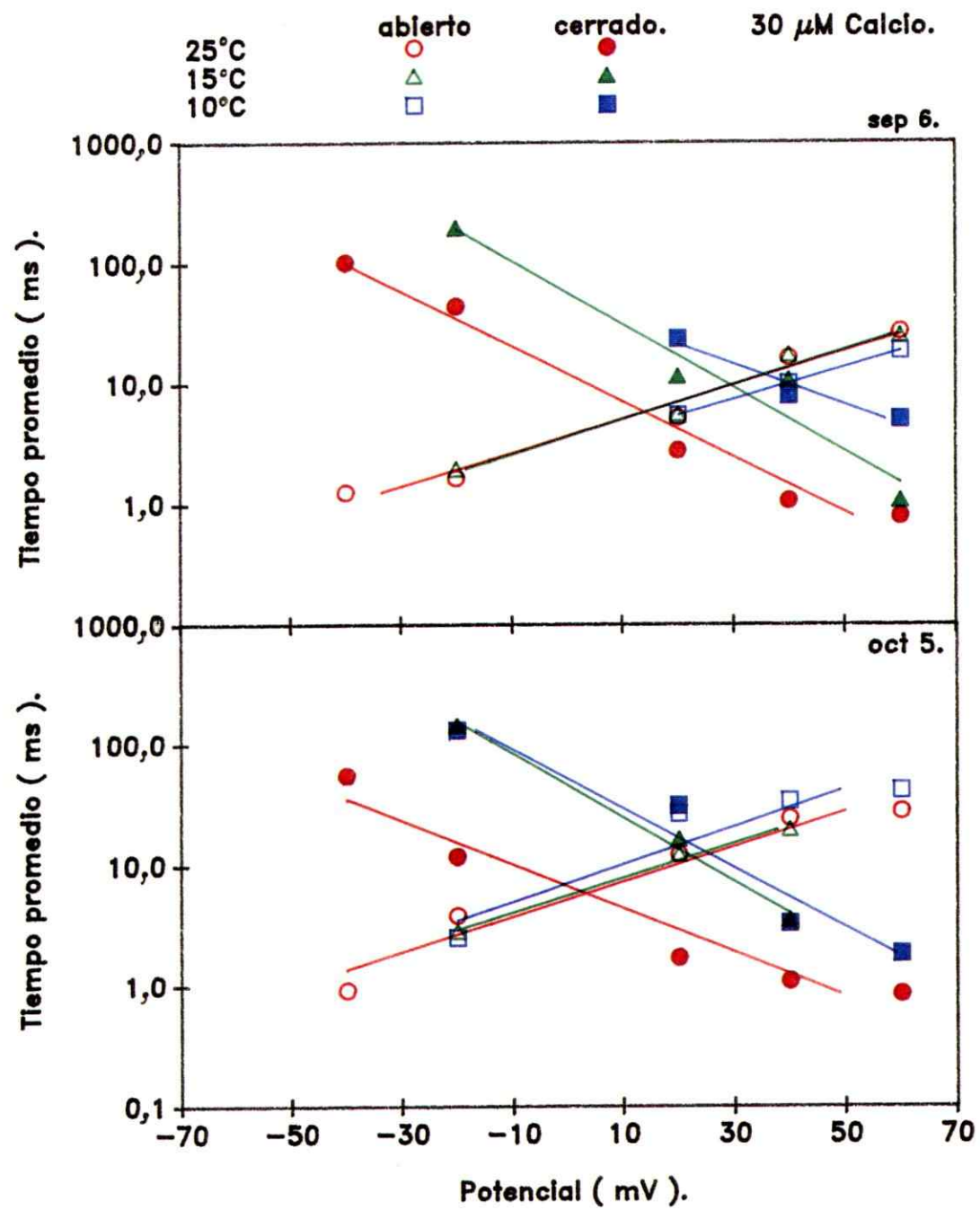
Si tratamos de obtener una representación visual de este efecto de la temperatura, recordemos la figura 2a, donde se muestra un registro a una concentración de calcio de $20 \mu\text{M}$ y a un potencial de $+40 \text{ mV}$. Se puede observar que una disminución de la temperatura aumenta la duración de los tiempos de residencia en los estados cerrados. En cambio la duración de los estados abiertos, aparentemente no son afectados por un descenso en la temperatura.

Figura 4.

Efecto de la temperatura sobre los tiempos promedios abierto y cerrado.

En dos experimentos (Sep 6 y Oct 5) hechos a una concentración de calcio de $30 \mu\text{M}$, se graficaron los tiempos promedios abiertos y cerrados en función del potencial aplicado.

Los símbolos abiertos corresponden a los tiempos promedios abiertos y los símbolos cerrados a los tiempos promedios cerrados. La línea roja corresponde a 25°C , la verde a 15°C y la azul a 10°C .



3.1.3.- Efecto de la temperatura sobre la cinética de abertura y cierre.

Los experimentos anteriores, mostraron el efecto conjunto de la variación de la temperatura y del potencial eléctrico sobre la probabilidad de abertura P_o .

Una pregunta interesante de responder, fue averiguar cual o cuales son las transiciones que muestran una mayor dependencia de la temperatura. Para ello se analizaron los tiempos de residencia en los estados abierto y cerrado, en función de la temperatura y de la concentración de calcio. En la figura 5 a y b, se muestra el análisis hecho en un experimento de reconstitución, el cual representa el comportamiento del canal de K^+ activado por Ca^{2+} .

Se puede observar en cada gráfico, que la distribución de los tiempos de permanencia es más ancha que lo esperado para un sólo estado abierto y un sólo estado cerrado.

Al considerar el efecto de la temperatura (a cada concentración de calcio fija), se observa un aumento de los tiempos cerrados y poco aumento de los tiempos abiertos.

Por otro lado, se observa para todos los valores de temperatura estudiados, que el aumento la concentración de Ca^{2+} tiene por efecto un aumento de la duración de los tiempos abiertos y una disminución de la duración de los tiempos cerrados.

3.1.4.- La disminución de la temperatura hace mas lenta la cinética de abertura y cierre.

En las siguiente figuras (Fig 5a-d) se muestran los resultados del ajuste hecho a los tiempos de residencia a dos concentraciones de calcio; en la tabla II se muestran los valores de las constantes de tiempo para cada componente, como también el número de los eventos del histograma que representan.

Se observa que a 25 °C, el canal de K⁺ activado por Ca²⁺, presenta cuatro componentes cinéticos, representadas en la figura 5 por dos funciones de densidad de probabilidad (líneas rojas y verdes) cuyos picos son las constantes de tiempo tau. En la medida que la temperatura disminuye a 15 °C y dependiendo de la concentración de calcio, estos tiempos promedios coherentemente aumentan de valor aunque en grado variable. Cabe hacer notar la aparición a esta temperatura de un tercer componente más rápido de tiempo cerrado a ambas concentraciones de calcio. A 7 °C, la tendencia a un desplazamiento a tau mayores persiste. Sin embargo, de manera consistente se encuentra un tercer componente para la distribución de abiertos y cerrados, caracterizado por un tiempo promedio de menor duración. La aparición de este tercer componente, en la ventana temporal de observación escogida, no es sorprendente, dado que una predicción de la relación de Eyring, es precisamente que la rapidez de una

transición disminuye al descender la temperatura. Esto significa un desplazamiento a tiempos promedios mayores. En este caso, esta disminución es suficiente para "aparecer" en el rango de tiempo impuesto para el análisis.

Figura 5.

Distribución de los tiempos de residencia de los estados abierto y cerrado en función de la temperatura y la concentración de calcio.

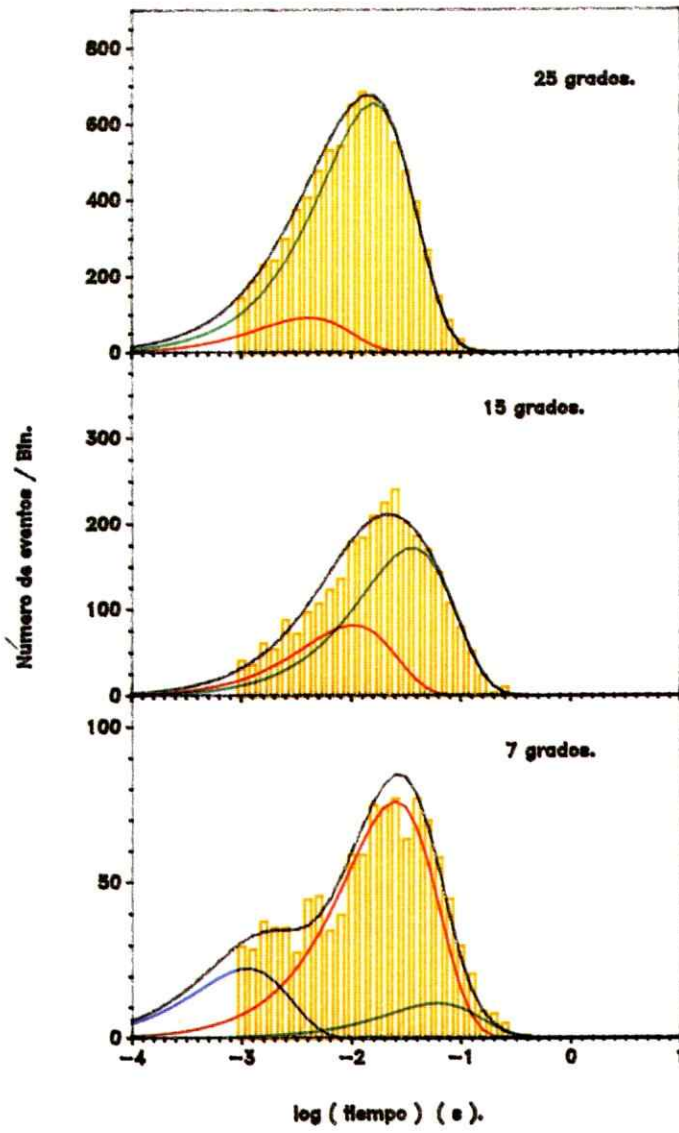
Las barras amarillas corresponden al histogramas de los tiempos de residencia experimental contruídos como es descrito en métodos. Las líneas continuas representan las componentes cinéticas distinguidas. La línea verde corresponde a la función de densidad de probabilidad de la componente cinética lenta. La línea roja a la componente rápida y la línea azul a la componente cinética más rápida. La línea negra representa la suma de cada función de densidad de probabilidad, la cual ajusta al histograma experimental.

a y b .- Tiempos de residencia de los estados abiertos y cerrados respectivamente, a una concentración de calcio de 20 μM . De arriba hacia abajo corresponde a 25, 15, 7 °C.

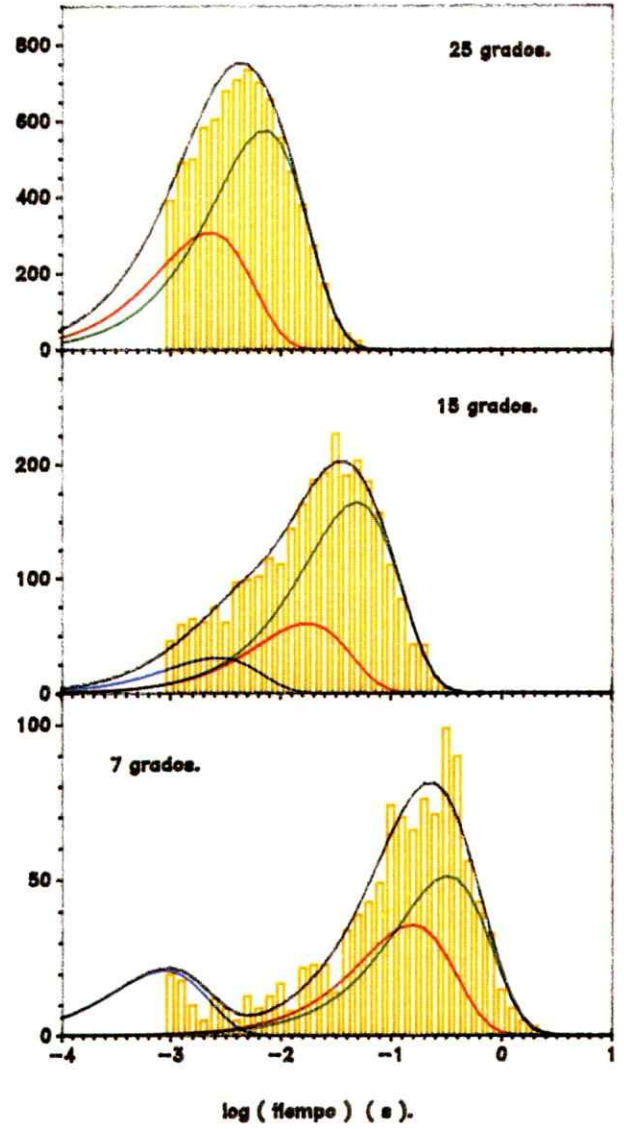
c y d .- Tiempos de residencia de los estados abiertos y cerrados respectivamente, a una concentración de calcio de 80 μM . Desde arriba hacia abajo corresponde a 25, 15, 7 °C.

Calcio $20 \mu\text{M}$.

Abiertos



Cerrados



Calcio $80 \mu\text{M}$.

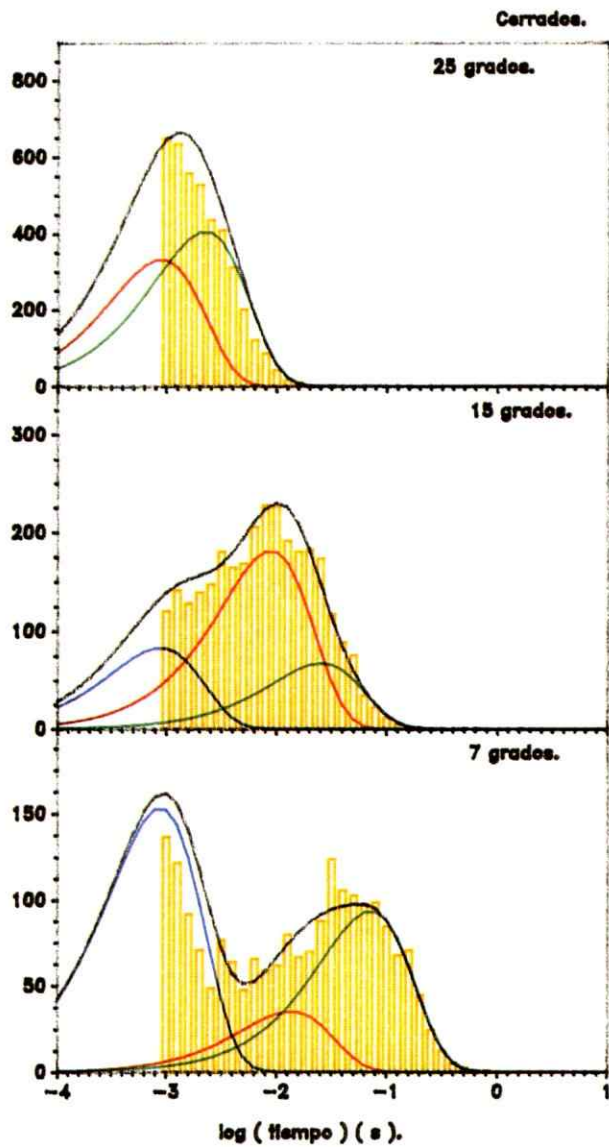
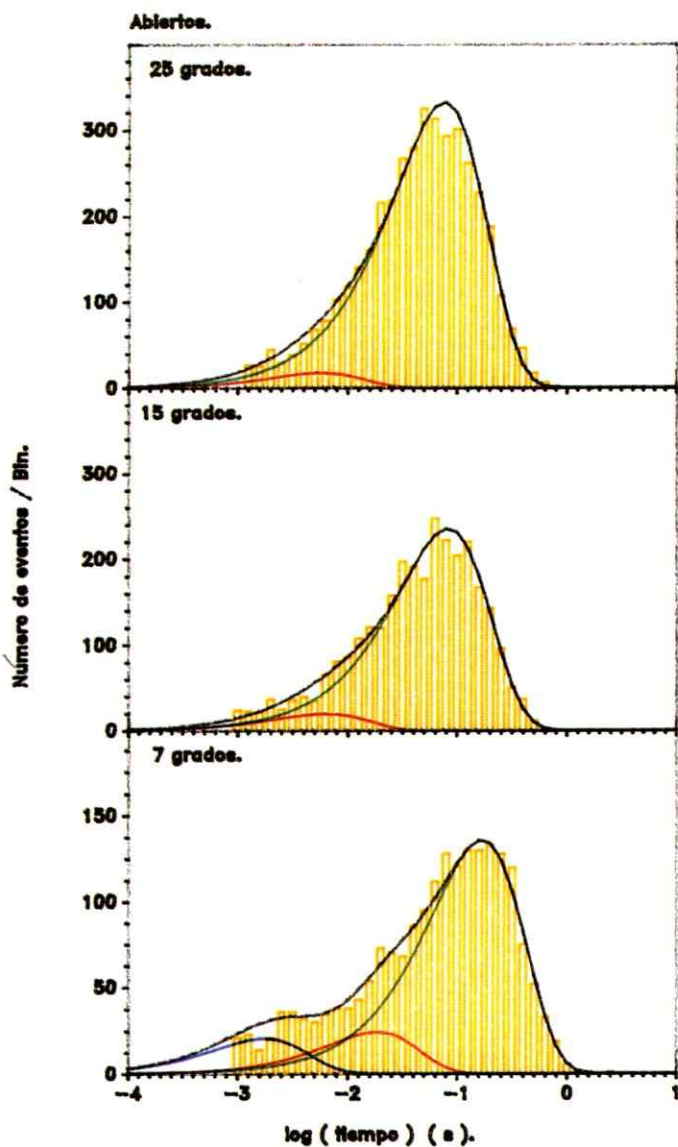


Tabla II.

Tiempos promedio abierto y cerrado a diferentes temperaturas
y concentraciones de calcio.

a.- Concentración de Calcio = 20 μ M.

	tau (ms)	d.e.	% eventos	d.e.	
25°C					
abierto	17,96	0,02	87,42	0,02	L
	4,50	0,03	12,58	0,02	R
log. de verosimilitud = $-0,2338107587 \times 10^5$					
cerrado	8,10	0,04	65,12	0,03	L
	2,55	0,05	34,78	0,03	R
log. de verosimilitud = $-0,2159722885 \times 10^5$					
15 °C					
abierto	40,67	0,06	67,64	0,05	L
	11,55	0,06	32,36	0,05	R
log. de verosimilitud = $-0,8598703668 \times 10^4$					
cerrado	55,66	1,05	64,40	0,05	L
	19,56	1,48	23,50	0,08	R
	3,01	3,04	12,10	0,08	
log. de verosimilitud = $-0,8804142279 \times 10^4$					
7 °C					
abierto	68,32	0,00 *	10,30	0,05	L
	28,38	16,84	69,02	0,06	R
	1,27	22,46	20,68	0,05	
log. de verosimilitud = $-0,3372425818 \times 10^4$					
cerrado	367,00	0,20	47,28	0,50	L
	175,00	0,09	33,22	0,50	R
	1,00	0,20	19,50	0,50	
log. de verosimilitud = $-0,3515093912 \times 10^4$					

b.- Concentración de Calcio = 80 μ M.

	tau (ms)	d.e.	% eventos	d.e.	
25°C					
abierto	68,30	0,03	94,80	0,03	L
	4,99	0,03	5,20	0,03	R
log. de verosimilitud = $-0,1229637818 \times 10^5$					
cerrado	2,50	0,06	55,03	0,07	L
	1,00	0,06	44,07	0,07	R
log. de verosimilitud = $-0,8442153557 \times 10^4$					
15 °C					
abierto	92,74	4,32	92,01	0,04	L
	7,00	9,27	7,09	0,04	R
log. de verosimilitud = $-0,9092546237 \times 10^4$					
cerrado	28,32	1,21	20,30	0,06	L
	9,90	0,45	54,81	0,05	R
	1,00	0,11	24,89	0,06	
log. de verosimilitud = $-0,8524757093 \times 10^4$					
7 °C					
abierto	190,07	6,56	75,00	2,77	L
	20,48	6,71	13,60	5,66	R
	2,00	0,88	11,40	5,66	
log. de verosimilitud = $-0,6478008527 \times 10^4$					
cerrado	80,06	3,75	33,30	4,43	L
	15,00	2,87	12,70	4,43	R
	1,00	0,10	54,00	1,18	
log. de verosimilitud = $-0,6301952223 \times 10^4$					

3.1.5.- Análisis termodinámico.

3.1.5.1.- El desplazamiento de las curvas de activación indica un aumento de la entropía en el canal.

Uno de los objetivos de esta tesis es caracterizar en términos termodinámicos el comportamiento del proceso de abertura y cierre del canal de K^+ activado por Ca^{2+} , al variar la energía interna de esta proteína. El enfoque mas simple en un análisis de este tipo, es suponer que el canal tiene sólo un estado abierto y un estado cerrado y que la transición entre ambos es dependiente del potencial. Un resultado para el valor de potencial donde ambas conformaciones están en equilibrio ($V_{0,5}$) es el siguiente :

$$V_{0,5}(T) = \frac{\Delta H - T \Delta S}{zF}$$

Al variar la temperatura entre T_1 y T_2 entonces,

$$V_{0,5}(T_1) - V_{0,5}(T_2) = \frac{(T_2 - T_1) \Delta S}{zF}$$

Si $T_2 > T_1$ y $V_{0,5}(T_1) > V_{0,5}(T_2)$ implica que $\Delta S > 0$.

La observación experimental de un desplazamiento hacia potenciales mas positivos de las curvas de activación, al disminuir la temperatura indica que, en el equilibrio el proceso de abertura y cierre va acompañado de un aumento en

la entropía del canal. La magnitud de los cambios de entropía y entalpía son los dados por la tabla siguiente:

Tabla III

Valores termodinámicos del proceso de activación del canal.

	ΔS (cal/mol $^{\circ}$ K)	ΔH (kcal/mol)
Sep.6	+38,60	+11,82
Oct.5	+41,96	+12,41

3.2.- Efecto de la temperatura sobre la conductancia.

En la figura 6a, se muestra la relación corriente-voltaje del canal de K^+ activado por Ca^{2+} en experimentos hechos a una concentración de KCl 100 mM en ambos lados de la cámara. En esta figura se puede apreciar que la pendiente de la relación corriente-voltaje disminuye según desciende la temperatura. La pendiente de esta curva es la conductancia de la corriente unitaria. En la figura 6b, tenemos una gráfica de Arrhenius de los valores para la conductancia del canal (ver tabla IV). Los puntos de la conductancia, son bien descritos por una recta, es decir, la entalpía de activación es constante en el rango de temperatura estudiado. Del ajuste a estos datos, se estimó que el cambio en la entalpía de activación fue de 4,14 kcal/mol y el cambio en la entropía de activación es -33 cal/mol °K. En esta misma figura, se han graficado los valores de la conductividad límite equivalente para el ión potasio en solución acuosa (Robinson y Stokes, 1972). Al hacer un ajuste a estos datos, similar al hecho a los datos de conductancia unitaria del canal, se estimó que la entalpía de activación fue de 3,16 kcal/mol y la entropía de activación tuvo un valor de -25,63 cal/mol °K. La diferencia entre la entalpía de activación para la conducción de potasio en solución y a través del canal es : 980 cal/mol. La diferencia en la entropía de activación para estos dos procesos de conducción de potasio es 7,4 cal/mol °K.

Figura 6.

Efecto de la temperatura en la conducción del ion potasio.

a.- Curvas de corriente vs. potencial.

Esta figura muestra la variación de la corriente unitaria del canal al variar el potencial como también al variar la temperatura.

La concentración de KCl en ambos compartimentos de la cámara fue de 100 mM.

b.- Gráfica de Arrhenius de la conductancia unitaria y la conductividad límite equivalente.

La conductancia fue estimada como la pendiente de una regresión de la relación I vs. V de los experimentos mostrados en la figura 6a.

Los valores de la conductividad límite equivalente fueron obtenidos del apéndice 6.2 del libro *Electrolyte Solutions* de R.A. Robinson y R.H. Stokes (1972).

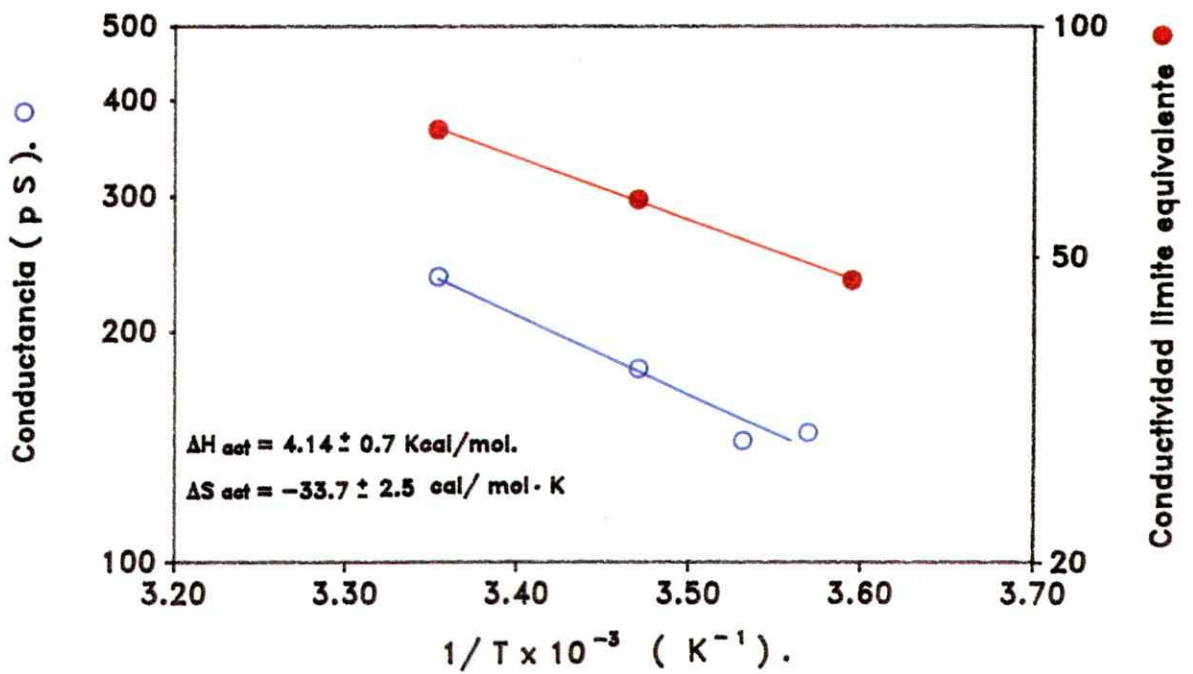
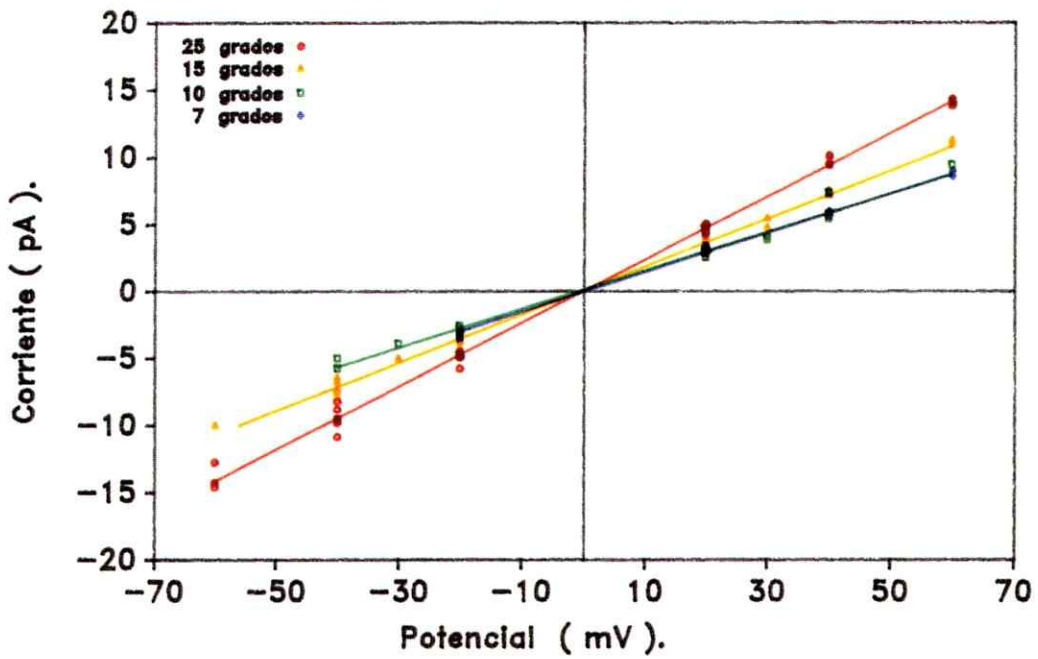


Tabla IV
Valores de la conductancia unitaria y la conductividad
límite equivalente.

Temperatura °C	Conductancia unitaria (pS)	Conductividad límite equivalente (cm ² /ohm equiv)
25	236 ± 2 (n=6)	73,5
15	179 ± 2 (n=6)	59,6
10	144 ± 4 (n=5)	----
7	148 ± 3 (n=4)	----
5	-----	46,7

4.- DISCUSION.

4.1.- El proceso de abertura y cierre del canal de K⁺ activado por Ca²⁺.

4.1.1.- ¿ Qué es el proceso de abertura y cierre de un canal iónico?.

Desde el advenimiento de la técnica de registro de canal único provenientes de membranas biológicas, la cinética de abertura y cierre ha sido un fenómeno sujeto a una intensa investigación científica de estas proteínas de membrana. El concepto más básico desarrollado para explicarlo, es la existencia de una compuerta ("gate") la cual ocluye o permite el tránsito de los iones por el poro acuoso del canal ("gating") (Hodgkin y Huxley, 1952). El tiempo que demora la compuerta en transitar desde un estado al otro, se considera que es aún menor que la resolución temporal del sistema de registro (Läuger, 1988). Sin embargo, el tiempo que la compuerta permanece en el estado abierto o en el estado cerrado puede variar en un rango de 10^{-4} - 10^1 segundos o más. Por lo tanto los tiempos de residencia observados del canal son un reflejo de movimientos internos de la proteína relativamente lentos.

La idea motivadora de este trabajo, ha sido observar estos movimientos lentos del canal de K⁺ activado por Ca²⁺, desde el punto de vista de los cambios en la entalpía y la entropía.

4.1.2.- Una interpretación del aumento de la entropía del sistema al abrirse el canal.

La medición de la probabilidad de encontrar el canal abierto en función de la temperatura, en dos canales que muestran una sensibilidad distinta al ion calcio, indica que cuando el canal se abre, la o las estructuras asociadas a la compuerta del canal pasan de un estado ordenado a uno más desordenado. Una manera de interpretar estos resultados es la siguiente: en el estado cerrado alguna estructura del canal, por ejemplo un segmento de α -hélice estabilizada por un número de enlaces de hidrógeno y/o puentes salinos, forma una estructura más "ordenada". Entonces, debido a la agitación térmica y sumada a la energía de unión del ion calcio a su sitio específico, un número cada vez mayor de enlaces de hidrógeno comienzan a romperse. Así, la energía se distribuye en un número mayor de componentes (cada enlace disuelto da lugar a lo menos dos grupos químicos que antes formaban una sola estructura, como también la formación de nuevos enlaces con moléculas de agua), esto significa un aumento de la entropía.

Por otra parte, se sabe que la energía necesaria para romper un enlace de hidrógeno es de 5 kcal/mol, entonces si se considera el valor calculado de la entalpía (ver tabla III), se tiene que el número de enlaces de hidrógeno asociados al proceso de abertura es entre 2 y 3. Por otro

lado, la observación de que es el tiempo promedio cerrado el más sensible a la temperatura, permite deducir que para que el canal pase del estado cerrado a abierto, se deben romper entre 2 y 3 enlaces de hidrógeno.

Una conclusión del análisis anterior es la necesidad de tener mas información estructural acerca del canal de K^+ activado por calcio. En todo caso, los resultados obtenidos delimitan el rango de posibles modelos del proceso de abertura y cierre del canal a nivel molecular.

4.1.3.- ¿ Qué parte de la estructura del canal puede originar estos movimientos internos ?.

En la interpretación hecha de los resultados, no ha sido casual el hacer referencia a un posible rol de estructuras del tipo de α -hélice como estructura subyacente al proceso de gating del canal de K^+ activado por Ca^{2+} . Aunque ésta es una hipótesis ad hoc, los argumentos presentados a continuación pueden fundamentarla.

4.1.4.- La estructura primaria y secundaria de canales iónicos.

La estructura primaria de varios canales iónicos, la cual ha sido deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de sus respectivos genes, muestra la existencia de segmentos cuya composición de aminoácidos le confiere características hidrofóbicas. Estas regiones hidrofóbicas están separadas por segmentos con características

hidrofílicas. La naturaleza apolar es un índice de que estos segmentos están embebidos en la matriz de lípidos. A partir de la estructura primaria, se ha sugerido que los aminoácidos se ordenan en estructuras de hélice, concretamente α -hélices, las cuales están estabilizadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares como también por interacciones hidrofóbicas. Unwin (Unwin, 1989) sugiere que esta estructura básica, es un arreglo constante para la diversidad de canales iónicos existentes.

4.1.5.- Modificaciones de la estructura primaria afectan la cinética de abertura y cierre.

En experimentos de expresión de genes que codifican para canales dependientes de potencial (Hoshi, 1990, Stühmer y cols., 1989, Oiki y cols., 1988), cuya secuencia ha sido modificada con el propósito de reemplazar uno a varios aminoácidos en sitios específicos, han mostrado que las propiedades de la cinética de abertura y cierre, específicas para cada canal son fuertemente modificadas. Estos resultados indican que procesos como la abertura e inactivación de estos canales dependientes de potencial, depende en gran medida de la organización y estabilización interna de las putativas α -hélices de estos canales, que participan de la cinética de abertura y cierre.

4.1.6.- El despliegue parcial de α -hélices y la cinética de abertura y cierre.

Englander y Kallenbach (1983), postulan que el proceso de intercambio de protones, donde el dador de hidrógeno es el agua y el aceptor de hidrógeno generalmente es el grupo amida en la cadena polipeptídica, ocurre con un despliegue parcial de α o β hélices, el cual "expone" al solvente el grupo funcional aceptor de hidrógeno. Ellos reportan que en experimentos de variación de temperatura, el cambio de la entalpía de activación para el proceso de intercambio de hidrógeno, ocurre en un rango entre +15 a +30 kcal/mol (pág. 598). Esta visión del proceso de intercambio de hidrógeno, se opone a un proceso de "penetración" del grupo dador de hidrógeno en la proteína, proceso cuya entalpía de activación está en un rango mayor (sobre 50 kcal/mol). Aunque el modelo postulado para el intercambio de protones aparentemente no tiene relación con el proceso de cinética de abertura y cierre, su valor radica en sugerir que la disolución de unos pocos enlaces de hidrógeno (tres o cuatro) que tiene por efecto un despliegue parcial de hélices, es un proceso común en las proteínas y que va acompañado de un cambio de entalpía de activación en el rango ya mencionado. En esta misma revisión, se indica que el proceso de intercambio de hidrógeno ocurre en un rango amplio de tiempo (desde 1 μ s a horas), pero que aquellos procesos

que involucran el rompimiento de enlaces de hidrógeno intramoleculares en una hélice de proteína, es un proceso relativamente lento. Esta indicación sugiere que el despliegue parcial de α -hélices, por disolución de enlaces de hidrógeno, puede corresponder a los movimientos lentos de la proteína asociadas a la cinética de abertura y cierre.

4.1.7.- ¿ Puede ser el plegamiento y despliegue parcial de α -hélices un correlato estructural de la cinética de abertura y cierre ?.

La metodología de registro de canal único, es hasta el momento el único procedimiento útil para estudiar el proceso de abertura y cierre de un canal iónico. En un estudio del movimiento de cargas asociado a la abertura y cierre del canal de sodio presente en nervio mielinado de *Xenopus laevis*, Jonas (Jonas, 1989) hizo experimentos de variación de temperatura usando la técnica de voltage controlado. Los resultados que el reporta respecto del movimiento de cargas asociados a un estímulo, indica que la respuesta al inicio del estímulo (respuesta on), al final del estímulo (respuesta off) y la constante cinética de inactivación del canal, dependen fuertemente de la temperatura. En cambio la cantidad de carga eléctrica no es afectada. El resultado que interesa en esta discusión, es que los valores para la entalpía de activación de los procesos estudiados, son del orden de 15 kcal/mol, y que ocurre con un cambio de entropía positivo. En

otro estudio de temperatura reportado, donde se hizo registro de canal único en un canal de potasio dependiente de potencial en linfocitos T, Pahapill (Pahapill y cols., 1990) al examinar la cinética de activación y la cinética de inactivación dependiente de potencial, reportan que los valores de la entalpía de activación para los procesos mencionados, están en el rango de 5 a 44 kcal/mol para el proceso de inactivación, entre 15 y 30 kcal/mol para el proceso de activación. La activación del canal va acompañada de un cambio positivo de entropía y la inactivación con un cambio negativo de entropía. Finalmente en un estudio con patch clamp hecho en *Loligo pealei*, de la cinética detallada del canal de sodio en el cual el proceso de inactivación fue removido por BTX; Bezanilla y Latorre (1991, manuscrito en preparación), elaboran un modelo para la cinética de abertura y cierre basado en el comportamiento de los componentes cinéticos del canal al variar la temperatura. Ellos demuestran que las constantes cinéticas que mejor ajustan el proceso de abertura y cierre, tienen entalpías de activación en un rango de 21 a 23 kcal/mol. Un resultado interesante que muestran, es que la curva de activación por potencial de este canal, muestra un desplazamiento hacia potenciales más negativos. Esto significa que el proceso de abertura del canal de sodio, ocurre con una disminución de la entropía, resultado diametralmente opuesto a la estimación del cambio

de entropía del canal de K^+ activado por Ca^{2+} de este trabajo. Esta diferencia puede surgir debido a que el proceso de abertura y cierre del canal de K^+ activado por Ca^{2+} no es dependiente del potencial (recordemos que es la unión de calcio al canal la que depende del potencial). En cambio al aplicar un potencial despolarizante, el movimiento de residuos cargados ubicadas en una hélice del canal de sodio, puede inducir una estructura más ordenada. Esta última hipótesis esta de acuerdo a las predicciones hechas por Caterall (1988) en su modelo de la cinética de abertura y cierre basado en los datos de la estructura primaria.

En resumen, los datos acerca de la entalpía de activación para procesos asociados a la cinética de abertura y cierre en diferentes canales, están en un rango que corresponde a la entalpía de activación del proceso de desplegamiento parcial de una hélice estabilizada por enlaces de hidrógeno.

4.1.8.- Los movimientos internos de un canal asociados a la cinética de abertura y cierre.

Desde hace pocos años que el proceso de abertura y cierre de un canal iónico se ha considerado que puede ser un reflejo de pequeñas fluctuaciones en estas proteínas (Liebovitch y cols., 1987; Läuger, 1988; Condat y cols., 1989; Millhauser, 1990; Oswald y cols., 1991). Este interés ha surgido como una necesidad de explicar la creciente

evidencia de que el proceso de abertura y cierre de los canales iónicos muestra numerosos componentes cinéticos. Esto ha inducido a proponer mecanismos físicos específicos, a partir de los cuáles se han desarrollado modelos estadísticos que han permitido explicar la distribución de los tiempos de residencia. Estos modelos requieren un número considerablemente menor de parámetros ajustables para describir los datos experimentales, hecho que no ocurre si se consideran los modelos ya clásicos de distribución exponencial de los tiempos de residencia. Lo singular de estas nuevas proposiciones, es que de algún u otro modo, se hace referencia a la dinámica estructural de las hélices estabilizadas por enlaces de hidrógeno. Los modelos desarrollados, muchos de ellos "se han probado", utilizando complejos algoritmos computacionales. Sin embargo datos estructurales sobre la dinámica de proteínas asociadas a la cinética de abertura y cierre, no ha sido reportados. Este trabajo sobre el canal de K^+ activado por Ca^{2+} , desde un punto de vista termodinámico, puede ser una evidencia de que los procesos que originan la cinética de abertura y cierre, sean los despliegues parciales de hélices estabilizadas por enlaces de hidrógeno.

4.1.9.- El proceso de abertura y cierre del canal de K^+ activado por Ca^{2+} tiene múltiples componentes cinéticos.

Una predicción de la teoría de Eyring es que una constante de rapidez disminuye exponencialmente su magnitud según disminuya la temperatura. En estos experimentos, se muestra evidencia de que existen componentes cinéticas del proceso de abertura y cierre a 25 °C que están fuera del límite de resolución temporal de un milisegundo, las cuales consistentemente aparecen a 7 °C. En los experimentos a 25 °C, se distinguen dos componentes cinéticas para el estado abierto y dos para el estado cerrado. A 7 °C se distinguen tres componentes para cada estado. La existencia de estos dos componentes cinéticos ha sido previamente demostrada por Moczydlowski y Latorre (1983) en experimentos realizados a temperatura ambiente. La aparición de un tercer componente para ambos procesos a 7 °C, también es concordante con experimentos hechos a temperatura ambiente en un canal de K^+ activado por Ca^{2+} de células de músculo esquelético en cultivo (McManus y Magleby, 1988). Ellos al examinar el proceso de abertura y cierre con una mayor resolución temporal (~ 50 μs , utilizando patch clamp), demuestran que la distribución de los tiempos de residencia en el estado abierto es ajustada por tres a cuatro componentes cinéticos y el estado cerrado por seis a ocho componentes. Este desplazamiento de las componentes cinéticas inducidos por la variación de la

temperatura, sugirió la existencia de una correspondencia entre las componentes observadas a 25 °C con aquellas observadas a temperatura inferiores.

La posibilidad de poder distinguir los componentes cinéticos, en función de la temperatura, podría potencialmente informar acerca de las etapas limitantes del proceso de abertura y cierre como también un análisis en términos termodinámicos del rol del calcio en la regulación de este canal. Sin embargo, existen tres serias limitantes para llevar a cabo este análisis:

1) Aunque fue posible lograr un ajuste con la suma de 2 ó 3 distribuciones exponenciales, la separación entre las componentes marcadas L y R no es lo suficientemente amplia para decidir con algún grado de certeza la diferencia entre componentes. Es decir, el ajuste encontrado puede ser simplemente una solución local del algoritmo de minimización para la estimación de parámetros.

2) Por otra parte, si el ajuste anterior pudiera distinguir claramente entre componentes cinéticas, no es posible responder con los datos obtenidos, la pregunta por la conexión entre estados observados. Esto es importante pues si existen varios componentes cinéticos, entonces los tiempos promedios encontrados por un método de ajuste corresponden a una combinación del inverso de cada una de las constantes cinéticas que salen desde un estado cinético. Una solución a

este problema es utilizar métodos de autocorrelación.

3) La corrección por eventos perdidos: Los histogramas contruidos no han incorporado la corrección de los tiempos de residencia por aquellos eventos que no ha podido ser detectados. Esta corrección es imposible de realizar con los datos obtenidos, pues significa saber de antemano cual es la distribución de los eventos que no pueden ser detectados. Es decir, se requiere de un modelo cinético previo, situación que es paradójica.

Sin embargo, a pesar de estas limitaciones metodológicas que no permiten un análisis formal de la cinética detallada del canal, un análisis de los datos tal cual como están, muestran una concordancia cualitativa y cuantitativa con el estudio ya presentado. Este análisis ,muy preliminar, no es presentado en esta tesis.

4.2.- El proceso de conducción de iones.

4.2.1.- El canal de K^+ activado por Ca^{2+} proporciona una vía de paso de baja energía libre.

El resultado de comparar la diferencia de entropía y entalpía de activación entre la conducción de potasio en solución y por el canal (7 cal/mol °K y 980 cal/mol respectivamente), indica que las estructuras del canal de K^+ activado por Ca^{2+} que participan en la conducción de potasio, proporcionan a éste ion un "ambiente fisicoquímico" con características similares al que tiene en solución libre. Esta afirmación no es sorprendente pues existe evidencia (por ejemplo Hartmann, 1991) que en la estructura de la vía de conducción de iones de los canales iónicos, existen grupos químicos con características polares los cuales participarían en el proceso de conducción de iones.

4.2.2.- En el rango de temperatura estudiado no existe evidencia de una modificación química del proceso de conducción de iones.

El valor de estos experimentos, es la demostración de que las estructuras químicas que participan del proceso de conducción de iones no son modificadas al variar la temperatura. Esta afirmación se fundamenta en el hecho que la gráfica de Arrhenius de las conductancias experimentales no muestra un cambio de pendiente apreciable, siendo casi paralela a la recta de la conductividad límite equivalente

(la diferencia de entalpía de activación es de 0,98 kcal/mol). Este resultado indica que la conducción del potasio por el canal, es un proceso limitado por la difusión del ion en la vía conductora. El hecho de que no exista un cambio de entalpía de activación al disminuir la temperatura, significa que la o las barreras de energía del paso limitante de la reacción son constantes y su dependencia de la temperatura es predicha por la ecuación de Eyring. Más aún, la diferencia de energía libre entre la solución y el pico de la (o las) barrera(s) de la etapa limitante, es similar a aquella obtenida por Villarroel (1989) ($1,8 k_B T$ vs. $2,5 k_B T$). Esta concordancia entre dos aproximaciones analíticas muy diferentes, indica que el modelo desarrollado por Villarroel, es una buena descripción del proceso de conducción de potasio.

5.- CONCLUSIONES.

En este trabajo se muestra evidencia que:

- El proceso de abertura es acompañado de un aumento en la entropía.

- La magnitud de la entalpía indica que en el proceso de abertura se rompen entre dos y tres enlaces de hidrógeno.

- El valor de la entalpía calculado es similar al reportado en la literatura para otros procesos asociados a la cinética de abertura y cierre en canales dependientes de potencial eléctrico.

- La magnitud de la entalpía descrita, está dentro de los límites de la entalpía para un proceso de despliegue parcial de una hélice estabilizada por enlaces de hidrógeno.

- Estos resultados aportan una pieza de evidencia a los modelos para la cinética de abertura y cierre, que se fundamentan en la dinámica de hélices estabilizadas por enlaces de hidrógeno.

Los resultados del efecto de la temperatura sobre el proceso de conducción de iones en el canal de K^+ activado por Ca^{2+} , indican que :

- La conducción de iones por el canal de K^+ activado por Ca^{2+} es fundamentalmente un proceso de difusión.

- El hecho que la entalpía de activación sea constante, evidencia que no hay un cambio químico en la estructura de la proteína (inducida por la disminución de la temperatura) que

afecte la conducción de potasio.

- El modelo de pozos y barreras propuesto, puede ser una descripción adecuada del proceso de conducción de potasio.

6.- BIBLIOGRAFIA.

- Alcayaga, C. 1987. Acoplamiento de los flujos de agua y iones en canales de potasio activados por calcio. Mediciones de potenciales de flujo. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Alvarez, O., Benos, D., Latorre, R. 1985. The study of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *J. Electrophysiol. Tech.* 12:159-177.
- Alvarez, O., Villarroel, A., Eisenman, G. 1991. Calculation of Ion Currents from Energy Profiles. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando.
- Bezanilla, F. Latorre, R. 1991. Effects of temperature on the kinetics of single BTX-modified Na⁺ channels in squid giant axon. Manuscrito en preparación.
- Caterall, W. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.
- Cecchi, X., Alvarez, O., Wolff, D. 1986. Characterization of a Calcium-Activated Potassium Channel from Rabbit Intestinal Smooth Muscle Incorporated into Planar Bilayer. *J. Membrane Biol.* 91:11-18.
- Cecchi, X., Alvarez, O., Latorre, R. 1987. Mechanism of Cs⁺ blockade in a Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *Biophys. J.* 52:707-716.

- Colquhoun, D., Hawkes, A. 1983. The Principles of Stochastic Interpretation of Ion-Channel Mechanism. Capítulo 9 en SINGLE CHANNEL RECORDING. Editores B. Sakmann y E. Neher. Plenum.
- Condat, C., Jackle, J. 1989. Closed time distribution of ionic channels. *Biophys. J.* 55:915-925.
- Eisenman, G., Latorre, R., Miller, C. 1986. Multi-Ion Conduction and Selectivity in the High-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel from Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 50:1025-1034.
- Englander, W., Kallenbach, N. 1983. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 16:521-655.
- Hartmann, H. 1991. Exchange of conduction pathways between two related K^+ channels. *Science* 251:942.
- Hille, B., Schwarz, W. 1978. Potassium Channels as Multi-Ion Single-File Pores. *J. Gen. Physiol.* 72:409-442.
- Hille, B. 1984. IONIC CHANNELS OF EXCITABLES MEMBRANES. Sinahuer Associates, Inc. Mass. USA.
- Hodgkin, A., Huxley, A. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:500-544.
- Hoshi, T. 1990. Biophysical and molecular mechanism of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* 250:533-538.

- Jonas, P. 1989. Temperature dependence of gating current in myelinated nerve fibers. *J. Membrane. Biol.* 112:277-289.
- Läuger, P. 1988. Internal motions in proteins and gating kinetics of ionic channels. *Biophys. J.* 53:877-884.
- Laurido, C. 1990. Estudio del efecto del pH en la activación del canal de potasio dependiente de calcio, incorporado en bicapas artificiales de fosfolípidos.
- Liebovitch, L., Sullivan, J. 1987. Fractal-analysis of a voltage-dependent potassium channel from cultured mouse hippocampal neurons. *Biophys. J.* 52:979-988.
- McManus, O., Magleby, K. 1988. Kinetic states and modes of single large-conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 402:79-120.
- Millhauser, G. 1990. Reptation theory of ion channel gating. *Biophys. J.* 57:857-864.
- Moczydlowski, E., Latorre, R. 1983. Gating kinetics of Ca^{2+} activated K^+ channel from rat muscle incorporated into panar lipid bilayer. Evidence of two voltage-dependent Ca^{2+} binding reaction. *J. Gen. Physiol.* 82:511-542.
- Oberhauser, A. 1987. Caracterización del sitio de unión de calcio del canal de potasio activado por calcio del músculo esquelético de la rata. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile.

- Oiki, S., Danho, W., Montal, M. 1988. Channel protein engineering: Synthetic 22-mer peptide from the primary structure of the voltage-sensitive sodium channel forms ionic channels in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2393-2397.
- Oswald, R., Millhauser, G., Carter, A. 1991. Diffusion model in ion channel gating. *Biophys. J.* 59:1136-1142.
- Pahapill, P., Schlichter, 1990. L. Modulation of potassium channels in human T lymphocytes: Effects of temperature. *J. Physiol.* 422:103-126.
- Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C., Ikemoto, N. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubular membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256:8140-8148.
- Robinson, R., Stokes, R. 1972 *ELECTROLYTE SOLUTIONS*. Segunda edición revisada. Butterworth & Co. Great Britain.
- Sigworth, F., Sine, S. 1987. Data Transformations for Improved Display and Fitting of Single-Channel Dwell Time Histograms. *Biophys. J.* 52: 1047-1054.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., Numa, S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature (Lond.)*. 339:597-603.
- Unwin, N. 1989. Is there a common design for cell membrane channels?. *Nature (Lond.)*. 323:12-13.

- Vergara, C. Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from Rabbit Muscle Incorporated into Planar Bilayers. J. Gen. Physiol. 82:543-568.
- Villarroel, A. 1986. Caracterización de las vías de acceso del canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético de rata. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Villarroel, A. 1989. Mechanism of Ion Conduction in the Large Calcium Activated Potassium Channel. Tesis de Doctorado Universidad de California.