

UCH-FC
MAB-B
C 217

**MODULACION DE LA CINETICA DE UN CANAL DE K⁺
ACTIVADO POR Ca⁺² POR CATIONES MONOVALENTES
EN PRESENCIA DE Ba⁺².**

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
SEBASTIÁN CANDIA GUTIÉRREZ

Enero de 1996



Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

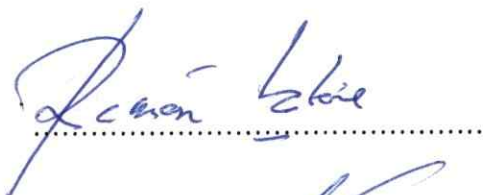
Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister Presentada por el candidato.

SEBASTIÁN CANDIA GUTIÉRREZ

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día de de 1996.

Director de Tesis:

Dr. Ramón Latorre



Comisión de evaluación de la Tesis:

Dr. Osvaldo Alvarez (Presidente)

Dra. Rosa Devés

Dr. Ricardo Bull



*Dedicado a vosotros Mamá y Papá,
que andáis siempre como errantes
a la búsqueda del camino más difícil y solitario.*

*Jamas os he visto iniciar
un día de entrega a vuestro hijo,
donde habéis terminado de expresarle
vuestro amor el día anterior.*

(Inspirado en los versos de Gibran Khalil)

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Ramón Latorre por su constante actitud y ejemplo de perseverancia. De él aprendí la diferencia que existe entre un profesor y un maestro.

Agradezco también al Dr. Osvaldo Alvarez, por sus puntuales y bien oportunas críticas a mi trabajo. Su ayuda también me permitió resolver algunos tediosos pero necesarios análisis con el computador.

Mis sinceros agradecimientos a mis compañeros de laboratorio, especialmente a aquellos con los que disfrutaba discutiendo algunos de mis resultados: Bernardo Morales, Laín F. Diaz, Juan M. Alarcón (aunque tuvo corta estadía en el laboratorio) y Rodolfo Madrid. A todos ellos mi cariño y gratitud.

Agradezco también el esfuerzo y la cooperación crítica de la Dra. Rosa Devés y el Dr. Ricardo Bull.

Mi trabajo en el laboratorio de Fisiología Celular fué posible gracias a la ayuda económica que recibí del Centro de Estudios Científicos de Santiago (C.E.C.S.).

Mi tesis fue financiada con los proyectos FONDECYT 863-91, 1134-1992 y 94-0227.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	VIII
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN	1
A. Generalidades	1
B. Canales iónicos	2
C. Características generales del bloqueo de canales iónicos	3
C.1 Bloqueo por Ba^{+2} de distintos canales de K^+	5
C.2 Canales de K_{Ca} activados por Ca^{+2}	6
C.3 El ion Ba^{+2} como sonda del K_{Ca}	8
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
A. Cámaras de reconstitución y formación de la bicapa	13
B. Protocolo experimental	14
C. Circuito de potencial controlado y convertor I-V	15
D. Análisis de los datos	16
RESULTADOS	19
A. Incremento en la duración de los τ_{PA} y τ_{PB} al variar el K^+_{ext}	19
B. El modelo incorpora al catión externo	26

C. Aplicación del modelo	29
D. Selectividad del sitio externo	31
E. TEA ⁺ como sonda del sitio externo	36
F. El efecto del potencial eléctrico sobre el sitio externo revela la existencia de una barrera externa	41
G. Incremento en los τ_{PA} y τ_{PB} al variar el K_{int}^+	45
DISCUSIÓN	48
A. Interpretación física de las constantes de rapidez	48
B. Interpretación del modelo con parámetros cinéticos y en equilibrio	50
C. Modelo físico propuesto	56
D. ¿ El TEA interactúa con el sitio externo ?	59
E. Los sitios periféricos: ¿ son los mismos que los descritos en el músculo esquelético?	60
CONCLUSION FINAL	62
REFERENCIAS	64
APENDICE	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.

Parámetros cinéticos y de equilibrio que determinan el bloqueo por el ion Ba^{+2} interno
(Potasio externo).30

Tabla 2.

Parámetros cinéticos y de equilibrio que determinan el bloqueo por el ion Ba^{+2} interno
(cationes externos).34

Tabla 3.

Parámetros cinéticos y de equilibrio que determinan el bloqueo por el ion Ba^{+2} externo
(Cationes internos).47

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Perfil de energía libre que siente un catión al unirse a un sitio localizado adentro de un campo eléctrico	4
Figura 2. Incremento en duración de los PB y los PA, al aumentar la concentración de K^+_{ext}	20
Figura 3. Histogramas para los PB y los PA en presencia de 0 y 1mM de K^+_{ext}	23
Figura 4. Duración de los PA y PB en función de la concentración de K^+ externo.	25
Figura 5. Modelo cinético.	27
Figura 6. Duración de los PA y los PB en función de la concentración de cationes externos.	32
Figura 7. Efecto inducido por TEA sobre los PA y los PB.	37
Figura 8. Determinación de la constante de disociación de TEA de su sitio de bloqueo.	40
Figura 9. Registros de canal único a diferentes potenciales.	42
Figura 10. Gráfico de los tiempos de permanencia vs voltaje y perfil hipotético para el Ba^{+2} .	43

Figura 11. Incremento en la duración de los PA y los PB, al aumentar la concentración interna de cationes. 46

Figura 12. Perfil de energía hipotético del interior del poro, con dos sitios que unen Ba^{+2} . 52

Figura 13. Resumen de las afinidades para Ba^{+2} y para K^{+} observadas en distintas condiciones iónicas. 58

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Estado abierto (conductor)
AM_{ext}	Estado abierto con un catión monovalente unido al sitio externo (conductor)
ABa	Estado abierto con Ba^{+2} adentro del poro (no conductor)
$ABaM_{ext}$	Estado abierto con Ba^{+2} y con un catión unido al sitio externo (no conductor)
B	Estado bloqueado (no conductor)
Ba	Ion bario agregado
C	Estado cerrado (no conductor)
CBa	Estado cerrado con Ba^{2+} adentro del poro (no conductor)
CTX	Caribdotoxina
I	Corriente
I_o	Corriente del canal en ausencia de bloqueador
$\langle I \rangle$	Corriente del canal en presencia de bloqueador
IbTX	Iberiotoxina
K_{ext}, K_{int}	Potasio externo e interno
k	Constante de Boltzmann ($1.3807 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)
K_{Ca}	Canal de K^+ activado por Ca^{2+}
KHz	Kilo Hertz

K_1, K_2	Constantes de asociación en ausencia y en presencia de Ba^{2+} .
K_a^1, K_a^2	Constantes de asociación de Ba^{2+} en ausencia y en presencia de K^+ .
K_d^1, K_d^2	Constantes de disociación de Ba^{+2} en ausencia y en presencia de K^+ .
MOPS	Ácido 3-(-N-morfolino)propanosulfónico
NMDG	N-Metil-D-Glucamina
PA	Períodos de actividad o "Burst"
PB	Períodos bloqueados
P_A, P_B	Probabilidad condicional de estar en el estado activo o bloqueado
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
pF	Picofaradio (10^{-12} Faradios)
pS	Picosiemens ($1S = 1$ Ampere/Volt)
T	Temperatura absoluta en grados Kelvin
TEA	Tetraetilamonio
t_c	Tiempo crítico para distinguir un estado cerrado de uno bloqueado
V	Voltaje
z	Valencia del ion

$z\delta$	Distancia eléctrica efectiva
α	Constante de rapidez de asociación
β	Constante de rapidez de disociación
δ	Fracción del voltaje de membrana en el sitio de bloqueo
τ_{PA}, τ_{PB}	Tiempo medio de vida en el estado activo o en el estado bloqueado

RESUMEN

El Ba^{+2} es un potente bloqueador del canal de K^+ activado por Ca^{2+} (K_{Ca}) de músculo esquelético. El Ba^{+2} se une a un sitio ubicado dentro del sistema de conducción del canal, impidiendo el paso de iones K^+ . Por esta razón se usó al ion Ba^{+2} como una sonda del sistema de conducción y se estudió el efecto de distintos cationes monovalentes sobre los tiempos medios activos (τ_{PA}) y bloqueados (τ_{PB}) del K_{Ca} de músculo liso. Se incorporó el canal de aorta de bovino en bicapas lipídicas planas para averiguar la localización de los sitios de unión adentro del poro y algunas de sus características.

Los resultados indicaron que:

1) Al elevar la concentración externa de un catión monovalente (M^+) (0 a 10 mM), los τ_{PA} y τ_{PB} aumentan su duración hasta alcanzar un valor límite. Los datos sugieren que los cationes que se unen a un sitio en el lado externo del poro impiden la salida de Ba^{+2} por ese lado y el Ba^{+2} se ve forzado a salir por el lado interno. La ocupación por M^+ del sitio externo dificulta también la entrada de Ba^{+2} , debido a una interacción electrostática.

2) Concentraciones crecientes de un catión en el lado interno (0 a 100 mM) del canal también aumentan la duración de los τ_{PA} y τ_{PB} . Esto sugirió la existencia de un sitio de

unión interno adentro del poro, con una afinidad menor por los cationes que la del sitio externo. La ocupación de este sitio interno fuerza al Ba^{+2} a salir por el lado externo.

3) De las observaciones anteriores se desarrolló un modelo cinético capaz de:

- a. Predecir el comportamiento saturante de los τ_{PA} y los τ_{PB} .
- b. Determinar la secuencia de selectividad de los sitios externo e interno en ausencia y en presencia del ion Ba^{+2} .
- c. Determinar las constantes cinéticas y las afinidades del ion Ba^{+2} al poro en ausencia y en presencia de cationes unidos a los sitios externos o internos. Las afinidades del ion Ba^{+2} no son afectadas en presencia de un catión monovalente, pero sí son afectadas las constantes cinéticas de entrada y salida de Ba^{+2} .
- d. Determinar las constantes de asociación o disociación para los cationes externos e internos en ausencia y en presencia de Ba^{+2} . La afinidad del sitio externo por los cationes es mayor que la del sitio interno, debido a que esta última es más afectada por la presencia de Ba^{+2} .
- e. Permite proponer un modelo físico hipotético con dos sitios internos que unen Ba^{+2} (con distintas afinidades) y los sitios para cationes monovalentes externo e interno.

ABSTRACT

The Ba^{+2} ion is a strong Ca^{+2} -activated K^+ Channel (K_{Ca}) blocker in smooth muscle. Ba^{+2} binds to the pore hindering ion conduction through the channel. This divalent cation was used as a probe of the conduction system. I studied the effect of different external and internal monovalent cations (M^+) on the burst and blocked periods in K_{Ca} channels. In order to investigate the location of cation binding sites into the pore, I incorporated the channel-forming protein into planar lipid bilayers. The results show that:

1) Increasing the external of monovalent cations (M^+) concentrations in presence of internal Ba^{+2} (200nM), the curves τ_{PA} or τ_{PB} versus $[M^+]$ shows saturations. From this observations, I developed a simple kinetic model able to predict these data. The data suggest that M^+ bind to a site at external site of the pore, precluding the exit of Ba^{+2} forward that side. When the site is occupied, Ba^{+2} exit the channel forward the internal side and the enter is slowed by electrostatic interactions.

2) External Ba^{+2} blockade (100 μ M) is affected by changes in the internal M^+ concentration in a similar way as external M^+ . At zero $[M^+]$ and a very large $[M^+]$, τ_{PA} and τ_{PB} have finite values. This behavior can be explain using a kinetic scheme similar to that used to explain

the effect of external $[M^+]$ over internal Ba^{+2} blocked. Moreover, the analysis of data suggest the existence of a M^+ binding site located forward the internal side of the pore, with an affinity lesser than the external site.

3) Using the kinetic scheme we might:

- a) Determine the selectivity sequence of internal and external M^+ site in the presence and absence of Ba^{+2} inside the pore.
- b) Determine the kinetics and affinity constants of the Ba^{+2} in presence y absence of M^+ .
- c) Determine the asociation and dissociation constant for the M^+ in presence and absence of Ba^{+2} .
- d) Allow us propose a hipothetical model with two binding sites for Ba^{+2} and with different affinities.

INTRODUCCIÓN

A.- GENERALIDADES

Las membranas biológicas separan los contenidos celulares del entorno de la célula. Estas membranas son estructuras fluidas, compuestas por una doble capa de fosfolípidos con cabezas polares expuestas a los medios extracelular y citoplasmático y colas hidrófobas mirando hacia el interior de la bicapa. A través de esta frontera se generan los gradientes de concentraciones fundamentales en la generación de potenciales de acción, en la secreción y en otras funciones fisiológicas. La membrana actúa también como un sensor de las señales externas. Uno de los procesos esenciales para los seres vivos es el desarrollo de una gran selectividad iónica por parte de las membranas celulares, que permita acumular K^+ al interior de la célula y excluir al Na^+ del citoplasma. Sin embargo, una cuidadosa selección para crear o disipar un gradiente no puede ser hecha por la bicapa lipídica propiamente tal, ya que la bicapa representa una barrera prácticamente impenetrable al paso de iones. Específicamente, la generación de un gradiente está a cargo de un tipo particular de proteínas integrales de la membrana celular, los **canales iónicos**.

B.- CANALES IONICOS

Los canales iónicos son proteínas intrínsecas que conectan las fases acuosas citoplasmática y extracelular y por donde atraviesan los iones en forma pasiva. En general, los canales iónicos son muy selectivos, lo que les permite crear gradientes iónicas. Hille, 1975 y Latorre y Miller 1983, delinearon algunas características típicas de enzimas que comparten los canales iónicos:

- a) La corriente que pasa a través de un canal iónico alcanza un valor máximo a concentraciones de sustrato (iones) lo suficientemente altas.
- b) En general tienen una fuerte especificidad por el sustrato (selectividad iónica).
- c) Análogos del sustrato (bloqueadores) compiten con el sustrato (iones permeables). Sustratos idénticos (iones idénticos) también compiten entre si.

Los canales iónicos pueden ser activados por agentes mecánicos, químicos o eléctricos, pero también pueden ser inhibidos o bloqueados por ellos. En esta tesis se utilizarán agentes químicos, como son los cationes monovalentes y los divalentes. La actividad de los canales se manifiesta como fluctuaciones entre un estado conductor abierto y uno no conductor cerrado. Esta actividad puede ser afectada por los cationes desde ambos lados de la membrana y en general sus efectos se manifiestan en cambios en la probabilidad de abertura o en algunos casos induciendo distintos niveles de conducción, los llamados sub-estados (Moczydlowski y Latorre, 1983).

C.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BLOQUEO DE CANALES

IONICOS.

En esta tesis se consideró que un bloqueador colocado en el compartimento interno, se liga a un sitio (pozo) ubicado dentro de la vía de conducción del canal y bloquea el paso de los iones capaces de atravesarlo (Ver **figura 1A** y Woodhull, 1973). En este caso la barrera de energía del lado externo es lo suficientemente grande como para impedir la salida del bloqueador hacia el lado externo. Nótese que en este modelo, el canal sólo puede estar ocupado por el ion permeante o por el bloqueador. El bloqueo es de tipo competitivo. Si el potencial (V), cae linealmente a lo largo del poro (**figura 1B**), el bloqueador unido a él es afectado una fracción $(1-\delta)V$ del voltaje aplicado. Una manera útil de entender la vía de conducción es a través de perfiles de energía, donde las barreras corresponden a máximos de energía (estados de transición o regiones de máxima resistencia) al paso de los iones desde un pozo a otro. En este tipo de esquemas, las constantes de rapidez de entrada o de unión (k_1) y de salida o de disociación (k_{-1}) dependen exponencialmente de la energía libre (ΔG) que define el tamaño de las barreras. Particularmente, el ion se liga a un sitio de unión bloqueando el flujo como lo haría un tapón.

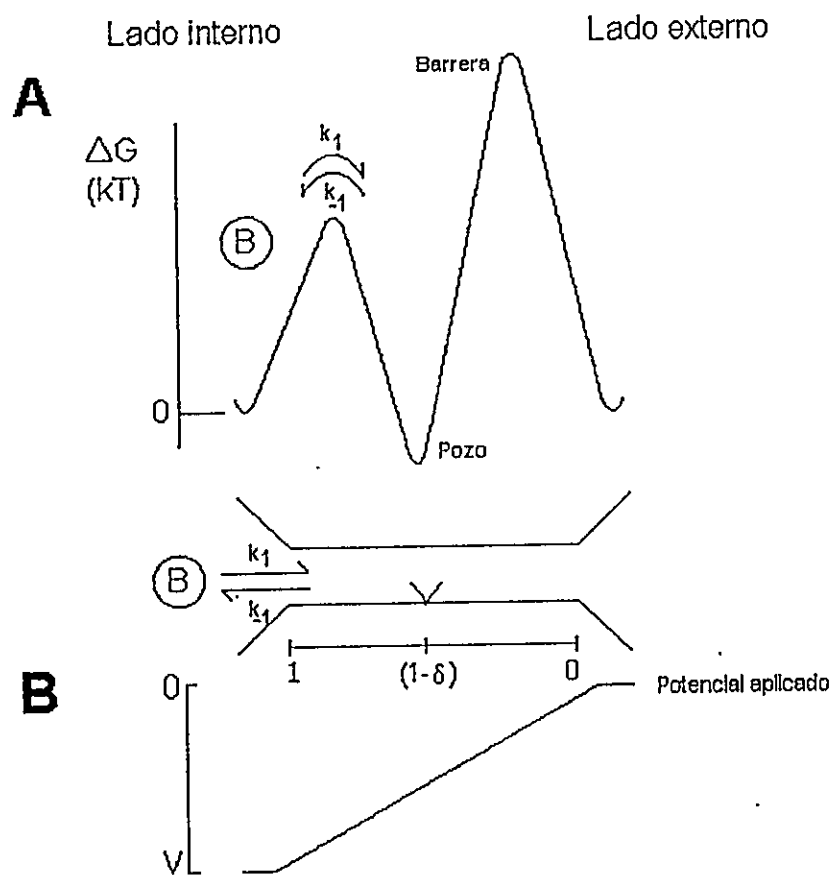


FIGURA 1

Perfil de energía libre que siente un catión al unirse a un sitio localizado adentro de un campo eléctrico.

A) En el caso de un bloqueador B, la barrera de salida hacia el lado externo debe ser mucho mayor que la barrera de entrada interna. La unión del bloqueador a su sitio requiere sobrepasar la barrera interna desde el lado citoplasmático. Abajo del perfil de energía se muestra el modelo de un poro con el sitio de unión. Tanto la entrada como la salida del bloqueador desde el sitio de unión se realiza con constantes de rapidez que le son características.

B) Cuando el potencial aplicado es distinto de cero, V contribuye al perfil de energía G_1 del ion de manera que $G_{i, total} = G_1 + zFV$. Donde zFV es la energía eléctrica por mol de carga.

Los bloqueadores se clasifican en tres clases generales:

- a) Un bloqueador lento es aquel que induce en un canal iónico, transiciones entre estados conductores y no conductores claramente reconocibles y su acción se mide mediante el cálculo de la frecuencia y la duración de las interrupciones de la corriente que pasa a través del canal. La duración media de los estados conductores y no conductores, se conoce como tau (τ). Algunos ejemplos de bloqueadores lentos son: el Ba^{+2} (Vergara y Latorre, 1983), la CTX (Miller y cols., 1985) y la IbTX (Candia y cols., 1992).
- b) Un bloqueador rápido, es aquel cuyo efecto se mide a través de una reducción en la corriente que pasa a través del canal. Ejemplos de esta clase de bloqueadores son: el Cs^{+} (Cecchi y cols. 1987) y el TEA⁺ (Vergara y cols. 1984).
- c) Bloqueadores de tipo intermedio. En este caso, las fluctuaciones entre el estado abierto y el estado bloqueado son más rápidas que aquellas entre el estado abierto y el cerrado del canal. Como ejemplo tenemos al Na^{+} agregado al lado citoplasmático del K_{Ca} de una célula cromafín. El análisis se hace usando el método de distribución de amplitudes (Yellen, 1984a). El estado bloqueado puede identificarse como transiciones entre estados conductores y no conductores que no se detectan en ausencia del bloqueador o bien como un aumento del ruido del estado abierto.

C.1 Bloqueo por Ba^{+2} de distintos canales de K^{+}

Se ha utilizado al ion Ba^{+2} para definir algunas características de la vía de conducción en diferentes canales de K^{+} (Adelman y col. 1978; Standen y col. 1978;

Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980; Armstrong y col. 1982). Las primeras evidencias que indicaban una modificación en la cinética de bloqueo por el ion Ba^{+2} en canales de K^+ , fueron las descritas por Armstrong y cols. 1980 en axón gigante de calamar. Sus estudios consistieron en perfundir el lado interno de axones gigantes de calamar y medir las corrientes inducidas al aplicar potenciales despolarizantes en presencia y ausencia de Ba^{+2} . En estas condiciones se describió un bloqueo por el ion Ba^{+2} dependiente del potencial. Después de lavar la solución interna para eliminar el Ba^{+2} introducido en los axones, se aplicó un pulso despolarizante y se observó que la corriente se recuperaba en dos fases, una fase rápida que fue interpretada como la salida rápida del ion Ba^{+2} desde canales abiertos, y otra fase lenta que fue interpretada como el reflejo de la liberación del Ba^{+2} desde canales que se habían cerrado dejando atrapado al Ba^{+2} en su interior. Armstrong y cols. 1982, reafirmaron esta interpretación, demostrando que el Ba^{+2} estabilizaba el estado cerrado del canal.

C.2 Canales de K^+ activados por Ca^{+2}

El K_{Ca} presenta la característica de ser activado por voltajes despolarizantes y por Ca^{+2} intracelular (Moczydlowski y Latorre, 1983). Este último rasgo es el que define de hecho a este tipo de canales y es muy atractivo por el hecho de preferir ciertos iones en lugar de otros (selectividad), junto con tener una de las mayores conductancias para el ion permeable observadas en canales iónicos (desde 180 a 250 pS en soluciones simétricas de KCl 100mM). Aunque esta es una característica general de los K_{Ca} , la sensibilidad al Ca^{+2} ,

la conductancia y la dependencia del potencial eléctrico son muy variables.

Se han descrito los K_{Ca} en muchas preparaciones, entre ellas, las células cromafines de bovino (Marty, 1981), el músculo liso de conejo (Cecchi y cols. 1986), los túbulos transversales de músculo esquelético de rata y de conejo (Moczydlowski y Latorre, 1983a; Vergara y Latorre, 1983), la musculatura lisa de arteria aorta de rata y de bovino (Sadoshima y cols. 1988; Slaughter, 1989) y los fibroblastos humanos (Stockbridge y French, 1988) entre otros.

El K_{Ca} de túbulo T es un canal capaz de aceptar varios iones simultáneamente en el interior del poro (ocupación múltiple); entre ellos K^+ (Neyton y Miller C. 1988b), NH_4^+ , Rb^+ (Eisenman y cols. 1986) y Cs^+ (Cecchi y cols. 1987).

En 1955, Hodgkin y Keynes demostraron que la razón de flujos unidireccionales a través de los canales de K^+ tiene un exponente mayor que uno. Esta observación sugiere que los canales de K^+ pueden ser ocupados por varios iones simultáneamente. Desde aquel estudio pionero, han habido muchas observaciones en los canales de K^+ que apoyan el modelo de ocupación múltiple para este canal. Algunos ejemplos son:

a) Una fracción molar anómala, donde a diferentes razones de iones capaces de atravesar el canal, se ven mínimos en la conductancia debido a las interacciones entre los iones y sus sitios de unión (Hagiwara y cols. 1977; Eisenman y cols. 1986). Este método no es siempre efectivo, ya que se sabe de canales multi-iónicos que no poseen esta característica (Yue y Marban, 1990):

b) Un bloqueo dependiente de voltaje de un ion con valencia z revela una distancia eléctrica fraccionaria, $\delta > 1$ (Hille y Schwarz, 1978).

c) La duración media del bloqueo por el ion Cs^+ , disminuye al aumentar la concentración de iones K^+ en el lado opuesto a donde actúa el bloqueador y aumenta al agregar el K^+ por el mismo lado desde donde actúa el bloqueador (Yellen, 1984b; Cecchi y cols. 1987).

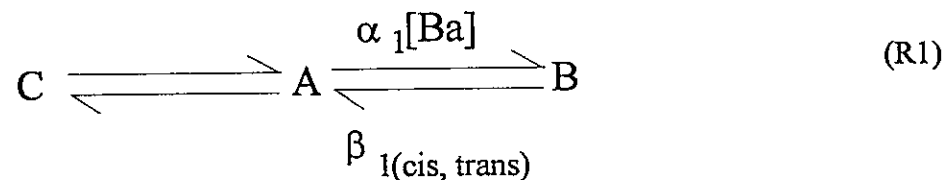
C.3.- El ion Ba^{+2} como una sonda del K_{Ca}

El primer intento en describir a nivel molecular el bloqueo por el ion bario fue llevado a cabo por Vergara y Latorre (1983) en el K_{Ca} de túbulo transversal en músculo esquelético; en este estudio se concluyó que:

a) Al adicionar Ba^{+2} a la solución que bañaba un canal aparecía una nueva población de estados cerrados, estos períodos cerrados más largos se interpretaron como bloqueos por el catión divalente.

b) El efecto del potencial eléctrico sobre el bloqueo por Ba^{+2} interno, sugiere que el sitio de unión del Ba^{+2} está localizado adentro del poro.

Los resultados permitieron postular el siguiente modelo:

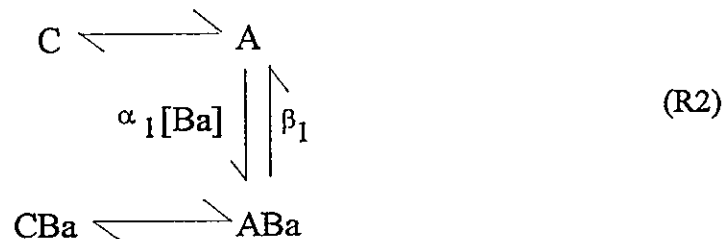


El esquema **R1** implica que:

- a) El canal antes de ser bloqueado (B) debe estar abierto (A).
- b) Los tiempos de permanencia en el estado de actividad (C y A) dependen inversamente de la concentración de Ba^{+2} .
- c) La duración de los tiempos de permanencia en el estado bloqueado son independientes de la concentración de Ba^{2+} .

Vergara y Latorre sugirieron por primera vez que la constante de salida de Ba^{+2} (β_1) poseía dos componentes: una salida por el lado interno *cis* y otra salida por el lado externo *trans*.

Miller 1987, demostró que el Ba^{+2} podía ser atrapado adentro del canal ya fuera hiperpolarizando o disminuyendo la concentración de Ca^{+2} interno. Esto lo llevó a modificar el modelo original (**R1**) por el modelo (**R2**), donde se sugirió la existencia de un estado bloqueado-cerrado (CBa) y otro bloqueado-abierto (ABa).



El modelo predice que el canal debe pasar por un estado bloqueado-abierto (ABa) antes de que el ion Ba^{+2} pueda salir del canal.

Neyton y Miller (1988b), usaron el bloqueo por Ba^{+2} como una sonda y describieron de manera simple y elegante la existencia de tres sitios independientes para K^+ en el K_{Ca} . El grado de ocupación de los tres sitios depende de las condiciones iónicas impuestas al canal. Neyton y Miller, 1988a observaron que un aumento en la concentración del K^+_{ext} hacía más lenta la disociación del Ba^{+2} desde el canal, es decir incrementaba la duración de los periodos bloqueados (PB). **Definiremos como PB a aquellos periodos no conductores mayores que un intervalo t_c .** Este intervalo será definido en los métodos.

Los modelos clásicos de interacción como el "knock-off" (este modelo consiste en que un ion ocasionalmente adquiere una energía cinética tal, que es capaz de chocar con un ion bloqueador y acelerar su salida) y la "repulsión electrostática", predicen que un aumento en la concentración de K^+_{ext} , debe incrementar la velocidad de disociación del bloqueador (la duración de los PB tiene que disminuir), sin embargo Neyton y Miller observaron lo contrario, es decir, la duración de los PB aumentaba. Para explicar este nuevo fenómeno plantearon la hipótesis que un ion K^+ se une a un sitio externo, impidiendo la salida del catión divalente por el lado externo (*trans*) pero no hacia el lado interno (*cis*), ya que $\tau_{off} = 1 / (k_{-1,cis} + k_{-1,trans})$ y $k_{-1,trans}$ es cero cuando el sitio externo esta ocupado por un catión monovalente. En ausencia de K^+_{ext} , el Ba^{+2} puede abandonar el canal por ambos lados (*trans* y *cis*). Al agregar K^+ al medio externo, el K^+ ocupa un sitio externo dentro del poro lo que impide la salida del Ba^{+2} por ese lado, esto permite la salida del ion Ba^{+2} sólo por el lado interno y esto se refleja en un incremento en la duración de los τ_{PB} .

Por otro lado, al aumentar la concentración de K^+_{ext} se observó una disminución de la constante de rapidez de entrada de Ba^{+2} (α_1 en R2), es decir aumentaban los períodos de actividad (PA) desde aproximadamente 200 ms en ausencia de K^+_{ext} hasta 10 s en 10 mM de K^+_{ext} . Definiremos PA (en inglés "burst") como aquellos intervalos de tiempo donde se observa la apertura y cierre rápidos del canal, entre dos períodos sin conducción mayores que un tiempo t_c . Sin embargo, el incremento en la duración de los PA no fueron bien descritos ni explicados cuantitativamente en conjunto con los aumentos en la duración de los PB (Neyton y Miller, 1988a).

OBJETIVOS

Usaré al Ba^{+2} como sonda de los sitios que unen cationes monovalentes adentro del poro del K_{Ca} .

Los objetivos específicos son:

- a) Determinar el efecto de los cationes externos e internos sobre los tiempos medios de los estados activos y bloqueados, ya que estos no han sido descritos de manera cuantitativa y simultánea.
- b) Proponer un modelo cinético que explique en forma conjunta los efectos inducidos por los cationes en presencia y ausencia de Ba^{+2} en el canal.
- c) Determinar algunas características de los sitios responsables de dichos efectos, tales como la selectividad para los cationes permeantes y no permeantes y su dependencia del potencial.

MATERIALES Y METODOS

A. CÁMARAS DE RECONSTITUCIÓN Y FORMACIÓN DE LA BICAPA

El método consistió en incorporar canales de K_{Ca} , en bicapas lipídicas artificiales, fusionando vesículas provenientes de membranas sarcolémicas de la musculatura lisa de aorta de bovino y ensayar distintas concentraciones de cationes externos o internos. Se usaron dos cámaras de Teflón separadas por un orificio de $400 \mu\text{m}$ de diámetro y en donde se pintó una bicapa lipídica con una vara de vidrio. La cámara *cis*, se define como aquella en donde se agregan las vesículas y que coincide con la exposición del sitio sensible al calcio del canal incorporado. La cámara *trans* es la opuesta. Se usaron dos electrodos reversibles Ag/AgCl con puentes de agar para pasar la corriente I, y fijar el potencial eléctrico de transmembrana V. El puente que conectó uno de los electrodos con la solución que tenía potasio, se llenó con agar-KCl 100 mM. El otro puente que conectó un segundo electrodo con la solución que no llevaba potasio, se llenó con agar-NaCl 100 mM para no contaminar con K^+ dicha cámara. Las bicapas lipídicas fueron formadas con una mezcla de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) en la razón 80/20% respectivamente y disuelta en n-decano. Las vesículas fueron preparadas por la Doctora María Luisa García ("Department of Membrane Biochemistry and Biophysics and Exploratory Chemistry, Merck Research Laboratories, New Jersey"), quién la proporcionó gentilmente. Estas

vesículas provienen de una fracción de membranas aórticas de bovino con origen sarcolémico y aisladas por centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa (Slaughter y cols. 1989). La evaluación del tipo de membrana se realiza midiendo la actividad de dos marcadores de membrana plasmática: Iodocianopindolol (interactúa con receptores β -adrenérgicos) y Ouabaina (interactúa con la Na-K-ATPasa).

B. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Las cámaras *cis* y *trans* fueron llenadas con una solución de MOPS 10 mM, titulada a pH = 7.0 con N-Metil-D-Glucamina (NMDG).
- 2) Se pintó la bicapa
- 3) En los experimentos con concentraciones variables de K^+ externo y concentración fija de K^+ interno, al lado *cis* se le agregó una cantidad exactamente medida de KCl concentrado para obtener una concentración final de 150 mM de K^+ .
- 4) Se agregó una cantidad medida de $CaCl_2$ concentrado al lado *cis* para obtener una concentración final de 100 μM de Ca^{+2} . En estas condiciones la probabilidad de apertura del canal fue ≈ 1 .
- 5) Se agregó la preparación al compartimento *cis*. Se agitó la solución para apresurar la incorporación que esta favorecida por el gradiente de concentración de KCl.
- 6) Una vez incorporado el canal único, se procedió a agregar una solución de NMDG-Cl concentrado hasta alcanzar una concentración final de 150 mM, pH = 7.0 al lado *trans* para

disipar el gradiente osmótico. Se usó NMDG en la cámara opuesta a la que lleva KCl 150 mM para evitar efectos debido a la carga superficial y debido a que este catión orgánico es incapaz de entrar al poro.

7) Se adicionó sucesivamente concentraciones crecientes de K^+ en el lado externo.

8) En los experimentos con concentraciones fija de K^+ externo y con K^+ interno variable, al lado *cis* se agregó NMDG-Cl 150 mM para favorecer la incorporación de las vesículas y una vez incorporado el canal, al lado *trans* se le agregó KCl concentrado para alcanzar una concentración final de K^+ de 150 mM. Finalmente se varia la concentración de K^+ en el lado interno. La temperatura en todos los experimentos fue de 23 ± 5 °C.

El N-Metil-D-Glucamina fue adquirido en Sigma Co. La medición de la concentración de K^+ contaminante se hizo con un espectrofotómetro de llama (Eppendorf, Geratebau) y la de Ba^{+2} contaminante se hizo con el método del ión común (precipitación de $BaSO_4$). En algunos experimentos preliminares se usó el quelante (Q) específico para Ba^{+2} , un éter corona de MERCK-Schuchardt ($C_{16}H_{24}O_{14}$) donado por el Dr. Jack Neyton ("Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, Paris").

C. CIRCUITO DE VOLTAJE CONTROLADO Y CONVERTOR I-V

La cámara interna o *cis* se conectó con un generador de pulsos y generador de niveles constantes (descrito en detalle por Alvarez, 1986), para controlar el potencial de membrana. La capacidad eléctrica de la bicapa de fosfolípidos se determinó de manera aproximada usando un generador de pulsos rectangulares. La magnitud del pico de la

corriente se comparó con la de un condensador de valor conocido (normalmente se obtuvo capacidades de 250 ± 30 pF). La cámara *trans* (tierra virtual) se conectó a un conversor de corriente a voltaje. El potencial de salida desde este circuito (reflejo de la corriente que pasa a través del canal) se amplificó y se filtró a 1 KHz (filtro activo Bessel de 8 polos). La corriente se visualizó en un osciloscopio y la señal se grabó usando un convertidor análogo digital (de 15000 muestras por segundo y de resolución de 8 bits) y una videograbadora para su análisis posterior.

D. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el análisis de los registros de la actividad de canales únicos. Se usó un PC 386 con el programa PCLAMP/FETCHEX LabMaster TM40 Versión 5.5.1, 1984-1990 de AXON INSTRUMENT, INC. para adquirir los datos a razón de 1000 muestras por segundo. Para analizar los datos e incorporar el registro al computador, se filtró desde 200Hz hasta un máximo de 25 Hz, cuando los registros lo requerían. Se usó el programa TRANSIT Versión 1.01, Houston, Texas. para el resto del análisis. Con el programa TRANSIT los eventos abiertos y cerrados de cada transición fueron identificados usando un discriminador al 50% de la corriente del canal abierto (Sigworth y Sine, 1987). El criterio para elegir el tiempo crítico usado para definir los PA (será explicado más adelante), emergió de las distribuciones exponenciales encontradas en los histogramas de frecuencia de eventos cerrados, que son construídos usando el método de Sigworth y Sine, 1987. En breve, la distribución de los tiempos de permanencia con más de una exponencial en un

histograma lineal (número de eventos vs tiempo), es difícil de interpretar. Para simplificar esta interpretación y mejorar el ajuste de las distribuciones, Sigworth expresó el eje de la ordenada como la raíz cuadrada del número de eventos y la abscisa como el logaritmo del tiempo. Para que la distribución tenga forma de campana, el ancho de los "bins" es siempre mantenido constante en la abscisa. Esta transformación es útil para graficar histogramas de distribución de más de un componente exponencial ya que tiene la ventaja de que cada componente exponencial se transforma en una curva con un máximo en la constante de tiempo de la distribución.

Elección del tiempo crítico t_c : En observaciones previas hechas en el laboratorio, los registros controles con Ba^{+2} contaminante han mostrado dos distribuciones exponenciales para los eventos cerrados con constantes de tiempo de alrededor de 5 y 150 ms aproximadamente. La primera de estas constantes correspondía a la distribución de los tiempos de permanencia en el estado cerrado y la segunda constante correspondía al bloqueo por Ba^{+2} . Como evidencias preliminares de esto último, tenemos que al agregar un agente quelante Q específico para Ba^{+2} , la frecuencia de aparición de bloqueos disminuía significativamente. Además la probabilidad de abertura total del canal incrementaba desde 0.8 a 1 en un rango que variaba desde 0 a 1 mM de Q. Por último, el componente menor con una media de 150 ms incrementaba en el número de eventos en presencia de Ba^{+2} adicionado y disminuía el número de eventos en presencia del quelante Q.

Como un PA se define como el estado de actividad entre dos PB, debemos definir un tiempo mínimo (t_c) de duración para los PB para no confundirlo con un estado cerrado.

De este modo, el tiempo crítico t_c o tiempo muerto para el análisis se definió como 10 veces mayor que el promedio de la constante de tiempo más rápida (5 ms) es decir 50 ms (casualmente la tercera parte de la constante de tiempo más lenta, 150 ms). Se define como el tiempo muerto del registro y del sistema de análisis, como aquella duración de intervalo bajo el cual todos los eventos son perdidos (Blatz y Magleby, 1986). Cuando la duración de los PA eran muy largos, los registros fueron analizados en el programa ANA (diseñado y adaptado por el Dr. Osvaldo Alvarez, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile) con el criterio de que los τ_{PA} estaban separados por períodos de al menos 50 ms. Una corrección por eventos perdidos (Blatz y Magleby, 1986) de los datos experimentales no fue necesaria, debido a que la corrección de un registro con Ba^{+2} agregado y en presencia de cationes monovalentes externos o internos, no mostró diferencia significativa entre el valor obtenido y el corregido (<1%).

El procedimiento usado para corregir por eventos perdidos, supone que el análisis comienza con un canal abierto con un intervalo mayor que el tiempo muerto (en éste caso 50 ms), la duración de intervalos sucesivos son adicionados al intervalo abierto hasta que un intervalo cerrado mayor que el tiempo muerto sea encontrado en el registro. Luego, parto con el intervalo cerrado y las duraciones de intervalos sucesivos son adicionados al intervalo cerrado hasta que un intervalo abierto con duración mayor que el tiempo muerto es encontrado. Este procedimiento se repite para todos los intervalos en un registro no corregido.

RESULTADOS

A. INCREMENTO EN LA DURACIÓN DE LOS τ_{PA} Y τ_{PB} AL VARIAR EL K^+_{ext}

Al agregar concentraciones crecientes de KCl a la solución externa de un K_{Ca} de músculo liso, la duración de los PB aumentó de manera dramática. La reclusión del ion Ba^{+2} al interior del poro del canal y en consecuencia el aumento en la duración de los PB, había sido ya descrito por Neyton y Miller 1988a en el K_{Ca} de músculo esquelético. Sin embargo al usar el K_{Ca} de músculo liso, además de observar el mismo tipo de cinética de bloqueo, llama la atención el aumento en la duración de los PA que no habían sido descrito con anterioridad.

La **figura 2** muestra un canal al que se le agregó cantidades crecientes de K^+ en el lado externo en presencia de Ba^{+2} interno 200 nM. Las concentraciones de K^+ usadas permiten discriminar cambios simultáneos en la duración de los PA y los PB desde 0.05 mM de K^+ (contaminante) hasta 3 mM de K^+ . Los tiempos medios de permanencia en el estado activo τ_{PA} crecen desde 0.15 a 2.31 s y los tiempos medios de permanencia en el estado bloqueado τ_{PB} crecen desde 0.24 a 5.25 s respectivamente. La media de los tiempos de permanencia en el estado bloqueado, del registro control (Ba^{+2} contaminante) y del registro con 200 nM de Ba^{+2} son idénticos ($\tau_{PB} = 150$ ms), sólo que en este último aumenta la frecuencia de aparición de los cerrados largos al haber mayor concentración de bario.

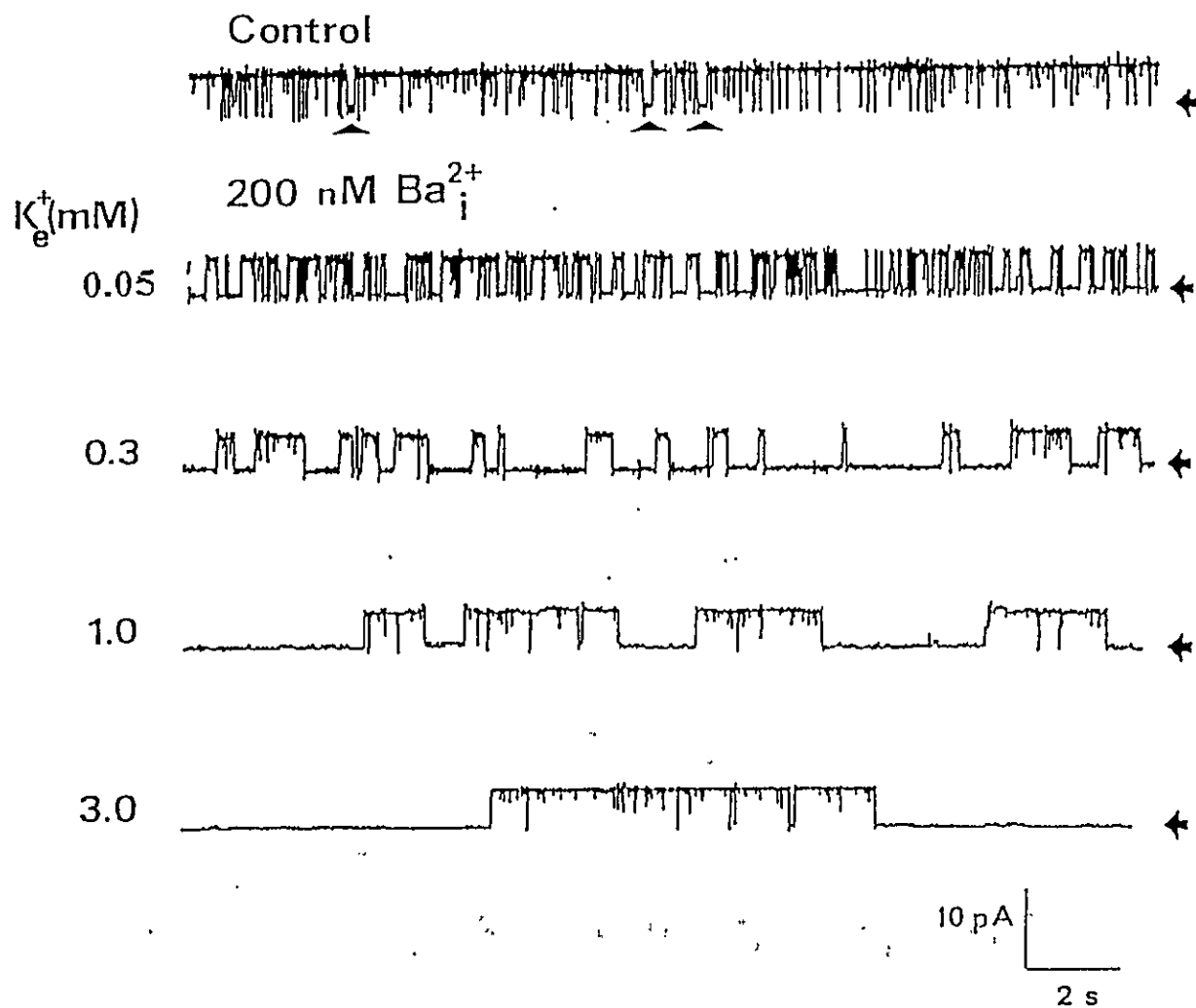


FIGURA 2

FIGURA 2

Incremento de los períodos bloqueados y activos

Las condiciones de registro de un canal K_{Ca} fueron: 10 mM MOPS-NMDG en ambos lados de la membrana. Lado interno o *cis*: KCl 150 mM y $CaCl_2$ 100 μ M. Lado externo o *trans*: MOPS-Cl⁻ 100 mM y K⁺ variable de 0.05 a 3.0 mM. Al canal se le aplicó un potencial de 0 mV y se filtró a 200 Hz. Los tres registros inferiores fueron filtrados a 25 Hz. Las flechas a la derecha indican el estado cerrado. El registro de corriente control se hizo con K⁺ externo y Ba⁺² interno contaminante (50 μ M y 10 nM respectivamente, ver métodos). La P_0 era > 0.8. En el registro control se observan tres bloqueos cortos inducidos por el ion Ba⁺² contaminante (cabezas de flecha). En el segundo registro se muestra la actividad del canal al elevar la concentración a 200 nM de Ba⁺² interno. La concentración de K⁺_{ext} de 0.05 mM indica que el registro fue tomado con K⁺ contaminante. Los registros siguientes muestran la adición creciente de K⁺ en el lado externo del canal. Los registros muestran claramente un aumento en la duración de los PA y los PB.

En las **figuras 3A y 3B** se muestran las distribuciones según Sigworth (ver en métodos) de los PB y los PA de otro canal, en condiciones de K^+ contaminante y Ba^{+2} 200 nM interno ($\tau_{PB} = 126$ ms y $\tau_{PA} = 155$ ms respectivamente). Las **figuras 3C y 3D** muestran la distribución de los PB y los PA en presencia de K^+_{ext} 1 mM y Ba^{+2} 200 nM interno ($\tau_{PB} = 3.400$ ms y $\tau_{PA} = 1.500$ ms). La distribuciones de los PB (**figuras 3A y 3C**) corresponden a aquellas que tiene un $\tau > 50$ ms (ver métodos). Los resultados indican que al agregar K^+ al lado externo, los τ_{PA} y los τ_{PB} incrementan en duración.

La **figura 3C** muestra dos componentes, uno de ellos es la distribución de los períodos bloqueados (triangulos negros) con un $\tau_{PB} = 3.400$ ms y otro componente más pequeño (triangulos blancos) con un $\tau = 140$ ms. Este último componente ($\tau = 140$ ms) corresponde a la misma distribución de bloqueados observado en la figura 3A ($\tau = 126$ ms). Al agregar K^+_{ext} , aparece una nueva población de bloqueados, cuya duración aumenta (se corre hacia la derecha) dependiendo de la concentración del catión adicionado.

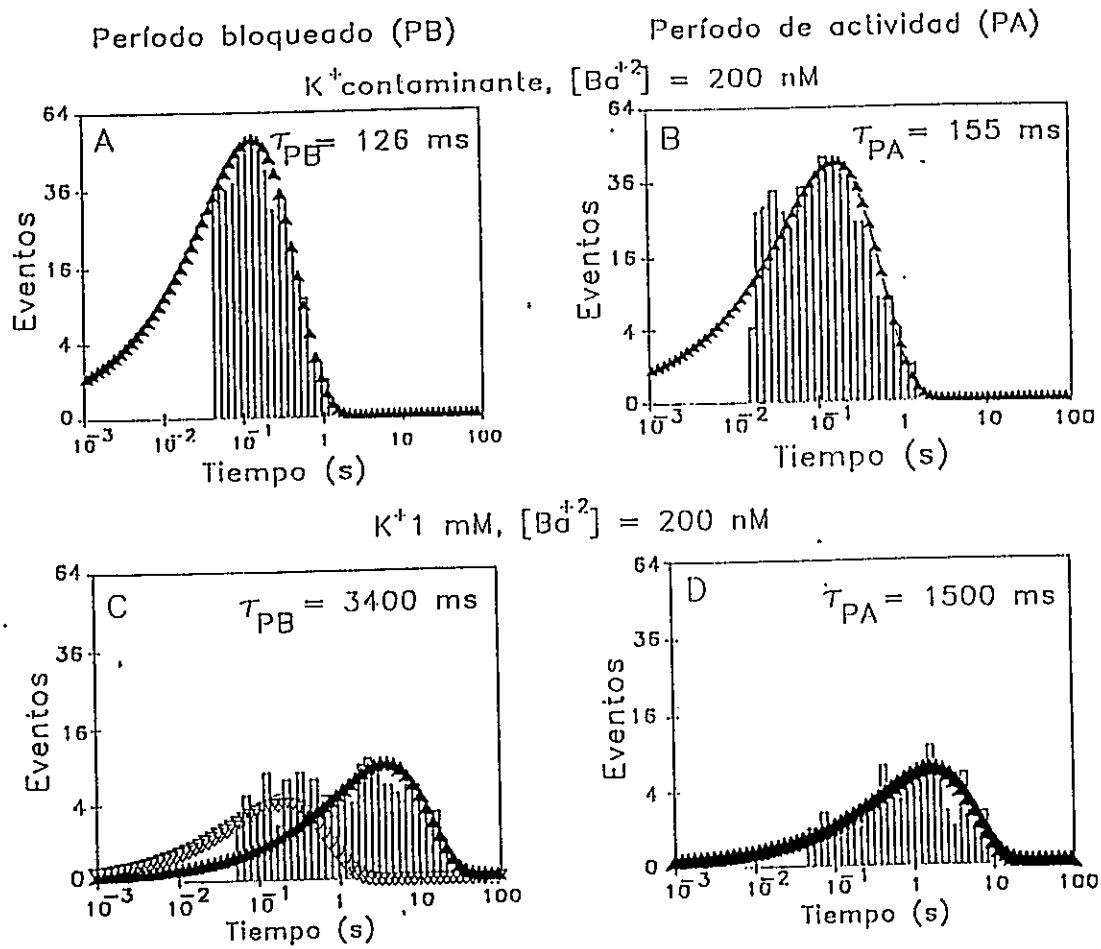


FIGURA 3

FIGURA 3

A y B: Distribuciones exponenciales de los histogramas para los PB y los PA respectivamente con K^+ contaminante (control) en un K_{Ca} . El número de observaciones para PB fue de 467 y para PA de 391.

C y D: La adición de 1 mM de K^+ externo incrementa los tiempos medios bloqueados y activos. El número de observaciones para PB fue de 137 y para PA de 72. Los PA se distribuyen como una sola exponencial, mientras que los PB se ajustan con dos exponenciales. El componente más rápido en el panel C que tiene una media de 140 ms corresponde a la distribución de los períodos bloqueados que se observa con K^+ contaminante en el panel A (de 126 ms).

El número de observaciones para los PB y los PA no es idéntico, ya que algunas de las ventanas de los registros fueron eliminadas por exceso de ruido. La fracción de intervalos cerrados menores que el tiempo muerto (50 ms) en A fue de 0.32 (32%) y en C fue de 0.01 (1%). La fracción de intervalos abiertos menores que el tiempo muerto en B fue de 0.27 (27%) y en D fue de 0.03 (3%) (Ver ecuaciones correspondientes en Blatz y Magleby, 1986)

En la figura 4 se graficaron los τ_{PA} y τ_{PB} vs la concentración de K^+_{ext} . Los τ_{PA} y los τ_{PB} mostraron una relación de tipo saturante. Estos resultados, están de acuerdo con los resultados previos de Neyton y Miller 1988a, quienes ajustaron las constantes de rapidez (valor inverso de τ) vs las distintas $[K^+]_{ext}$ con hipérbolas rectangulares.

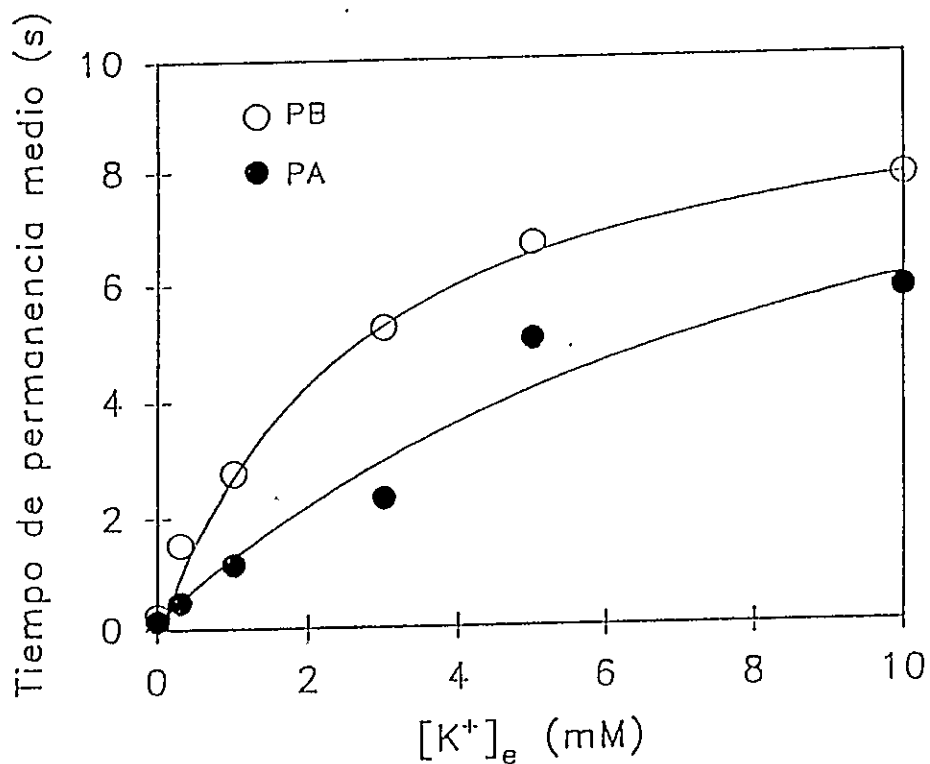


FIGURA 4

Duración de los PA y PB en función de la $[K^+]$

Los datos experimentales provienen del experimento de la figura 2. Los círculos negros indican los τ_{PA} y los círculos blancos indican los τ_{PB} . Los datos experimentales se asemejan a una curva saturante. El ajuste de los puntos (curva sólida) fue hecho con las ecuaciones 3 y 4 derivadas del modelo cíclico R3 en la figura 5A.

B. EL MODELO INCORPORA AL CATION EXTERNO

Con los modelos **R1** y **R2** previamente propuestos en las paginas 8 y 9 (Vergara y Latorre 1983; Miller, 1987), no es posible dar cuenta del incremento en la duración de los τ_{PA} y τ_{PB} causado por el incremento de la concentración de K^+_{ext} , por esta razón propongo un modelo cinético alternativo. El modelo **R3** se aprecia en la **figura 5A**, donde M^+_{ext} corresponde al catión adicionado que se une a un sitio externo adentro del poro del canal y Ba es el bloqueador agregado en el lado interno. Supusimos aquí que la probabilidad de apertura del canal debe ser cercana a 1 para que el estado cerrado C del esquema R2 pueda ser desestimado en R3 (**figura 5A**).

En ausencia de K^+_{ext} (sólo el contaminante) y en presencia de K^+_{ext} ($M^+_{ext}=K^+_{ext}$), el análisis de las distribuciones de los períodos activos (A y AK_{ext}) indican que ambos presentan un comportamiento cinético que se ajusta con una exponencial simple (triangulos negros en la **figura 3B** y **3D**). En cambio, en ausencia de K^+ los períodos bloqueados (ABa y ABa K_{ext}) se comportan como una sola exponencial (**figura 3A**) y en presencia de K^+ como dos exponenciales (**figura 3C**). Esto quiere decir que la cinética de unión entre el K^+_{ext} y el poro es más rápida en ausencia que en presencia de Ba^{+2} , lo que sugiere la existencia de un mecanismo electrostático entre Ba^{+2} y el catión monovalente.

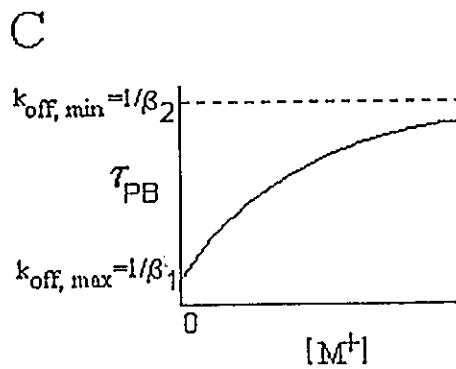
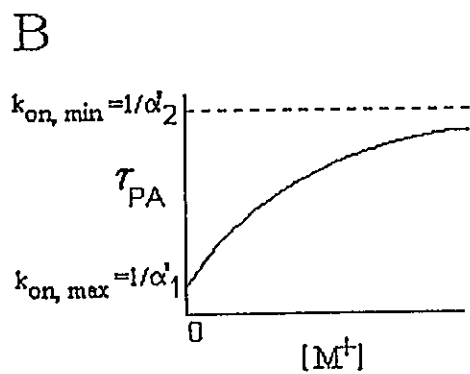
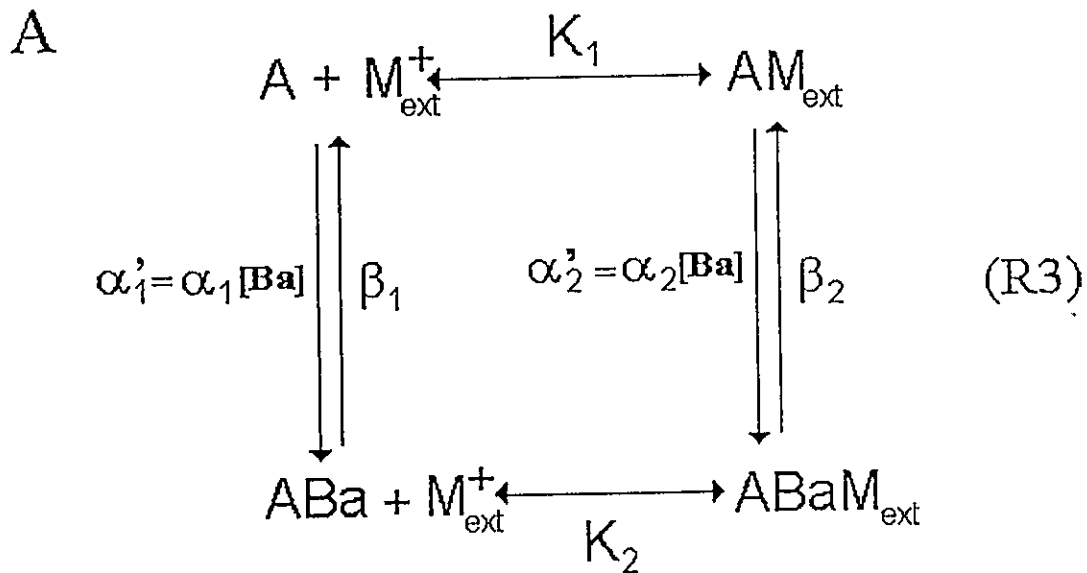


FIGURA 5

FIGURA 5

A) Modelo usado para dar cuenta de la modulación del bloqueo por Ba^{+2} interno mediante un metal monovalente (M^+). El modelo es valido para cationes internos y externos. M^+ representa a los cationes expuestos en este trabajo (K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Li^+ , TEA^+). La constante α_1' ($= \alpha_1[Ba]$) es la constante de rapidez de entrada de Ba^{+2} en ausencia de la unión de un catión externo, α_2' ($= \alpha_2[Ba]$) es la constante de rapidez de entrada de Ba^{+2} en presencia de un catión externo, β_1 es la constante de rapidez de salida de Ba^{+2} en ausencia de un catión externo y β_2 es la constante de rapidez de salida de Ba^{+2} en presencia de un catión externo. Las constantes K_1 y K_2 son las constantes en equilibrio de asociación de un catión monovalente al canal en ausencia y en presencia de Ba^{+2} interno respectivamente.

B y C) Significado de las constantes cinéticas y su relación con los τ_{PA} y los τ_{PB} en función de la concentración del catión externo. Los interceptos $1/\alpha_1'$ y $1/\beta_1$ corresponden a $k_{on,max}$ y $k_{off,max(trans+cis)}$ respectivamente. Las asíntotas $1/\alpha_2'$ y $1/\beta_2$ corresponden a $k_{on,min}$ y $k_{off,min(cis)}$ respectivamente (ver sus significados físicos en la discusión).

El modelo R3 en la **figura 5A** predice que los τ_{PA} y los τ_{PB} están dados por las siguientes relaciones (Su derivación algebraica está en la sección Apéndice):

$$\tau_{PA} = (1 + K_1[M]) / (\alpha'_1 + \alpha'_2 K_1[M]) \quad (3)$$

$$\tau_{PB} = (1 + K_2[M]) / (\beta_1 + \beta_2 K_2[M]) \quad (4)$$

Donde $\alpha'_n = \alpha_n[Ba]$. Ambas ecuaciones son del tipo saturante, ya que si $[M]=0$, τ_{PA} tiende a $1/\alpha'_1$ y τ_B tiende a $1/\beta_1$ que corresponden al intercepto con la ordenada. Si $[M]$ es muy grande, τ_{PA} tiende a $1/\alpha'_2$ y τ_{PB} tiende a $1/\beta_2$ que corresponden a la asíntota de la curva de saturación (**figuras 5B y 5C**).

C. APLICACIÓN DEL MODELO

Del ajuste con las ecuaciones 3 y 4 a los datos experimentales (**figura 4**), podemos obtener los parámetros cinéticos que determinan el bloqueo por Ba^{+2} . En la **Tabla 1** se observan las constantes de rapidez de asociación de segundo orden (α_1 y α_2) y las de rapidez de disociación de primer orden (β_1 y β_2) para la reacción canal- Ba^{+2} en ausencia y en presencia de un catión unido al sitio externo respectivamente (Ver modelo **R3**). Al analizar los datos para el ion K^+ , se observa que las constantes α_1 y α_2 para Ba^{+2} son de 3×10^7 y $4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}M^{-1}$ y las constantes β_1 y β_2 son 0.1 y 4.43 s^{-1} respectivamente.

La razón α_1/α_2 , indica que el ion Ba^{+2} entra 75 veces más rápido cuando no hay K^+ en el sitio externo que cuando el ion está presente en el sitio. Esto puede ser explicado por

una interacción electrostática entre los cationes. La razón β_1/β_2 , indica que el ion Ba^{+2} se disocia del mismo canal 44 veces más rápido cuando no hay K^+ unido al sitio externo que cuando lo hay. Estos resultados indican que la presencia de K^+ en el sitio externo está dificultando tanto la entrada como la salida del ion Ba^{+2} desde el canal y la interpretación más simple es que al agregar K^+ en el lado externo, la barrera externa crece más que la barrera interna y la energía necesaria para que un ion Ba^{+2} que esta adentro del poro sobrepase esta barrera es tan alta que impide la salida del Ba^{+2} por ese lado. La única salida posible para el Ba^{+2} es hacia el lado interno (con una barrera de energía menor) (Alvarez, O y cols., 1992). Una interpretación análoga es válida para la presencia de K^+ en el sitio interno.

TABLA 1

	α_1 ($s^{-1}M^{-1}$)	α_2 ($s^{-1}M^{-1}$)	K_1 (mM^{-1})	β_1 (s^{-1})	β_2 (s^{-1})	K_2 (mM^{-1})	α_1/α_2	β_1/β_2
K^+	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^5$ $\pm 1.5 \cdot 10^5$	8.4 ± 2.3	4.43	0.1 $\pm 4 \cdot 10^{-3}$	16.7 ± 1.28	75	44

Parámetros cinéticos y de equilibrio que determinan el bloqueo por el ión Ba^{+2} . El catión de la izquierda fue agregado en el lado externo. Los parámetros α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , K_1 y K_2 (las últimas dos son constantes de asociación) fueron obtenidas ajustando las ecuaciones 3 y 4 (en página 29) a los datos experimentales mostrados en la figura 4 (curva solida). Media \pm desviación estandar.

Nota: Para calcular τ_{PA} con la ecuación 3, se debe tomar en cuenta la relación $\alpha' = \alpha[Ba]$, donde $[Ba] = 200$ nM.

D. SELECTIVIDAD DEL SITIO EXTERNO

La **figura 6** muestra el estudio de la selectividad del sitio externo ensayando distintos cationes permeables y no permeables.

Se cuantificó el grado de selectividad reemplazando el K^+ por Rb^+ o NH_4^+ (**figuras 6A y 6B**) que pueden atravesar el canal, o por el ion Cs^+ (**figura 6C**) capaz de atravesar parte de la vía de conducción para bloquear el canal, o por Li^+ (**figura 6D**) que es incapaz de atravesarlo. Para cada catión se llevó a cabo el mismo procedimiento hecho con el K^+_{ext} en canales independientes. Las constantes cinéticas y de equilibrio de los distintos cationes monovalentes están ordenadas en la **Tabla 2**. La secuencia de selectividad en la unión vista a través de la constante de asociación en mM^{-1} en ausencia (K_1) y en presencia (K_2) (valores en paréntesis) de Ba^{+2} son:

$$K_1: Rb^+(22) > K^+(8.4) > NH_4^+(3.15) > Cs^+(0.58) > Li^+(0.03). \quad (R5)$$

$$K_2: Rb^+(108) > K^+(16.7) > Cs^+(9.1) > NH_4^+(1.35) > Li^+(0.05).$$

Al ajustar los datos experimentales con las ecuaciones 3 y 4, se encuentra que los cationes permeables tienen el mismo patrón de saturación que el K^+ . En términos generales el sitio externo es más selectivo para Rb^+ que para K^+ .

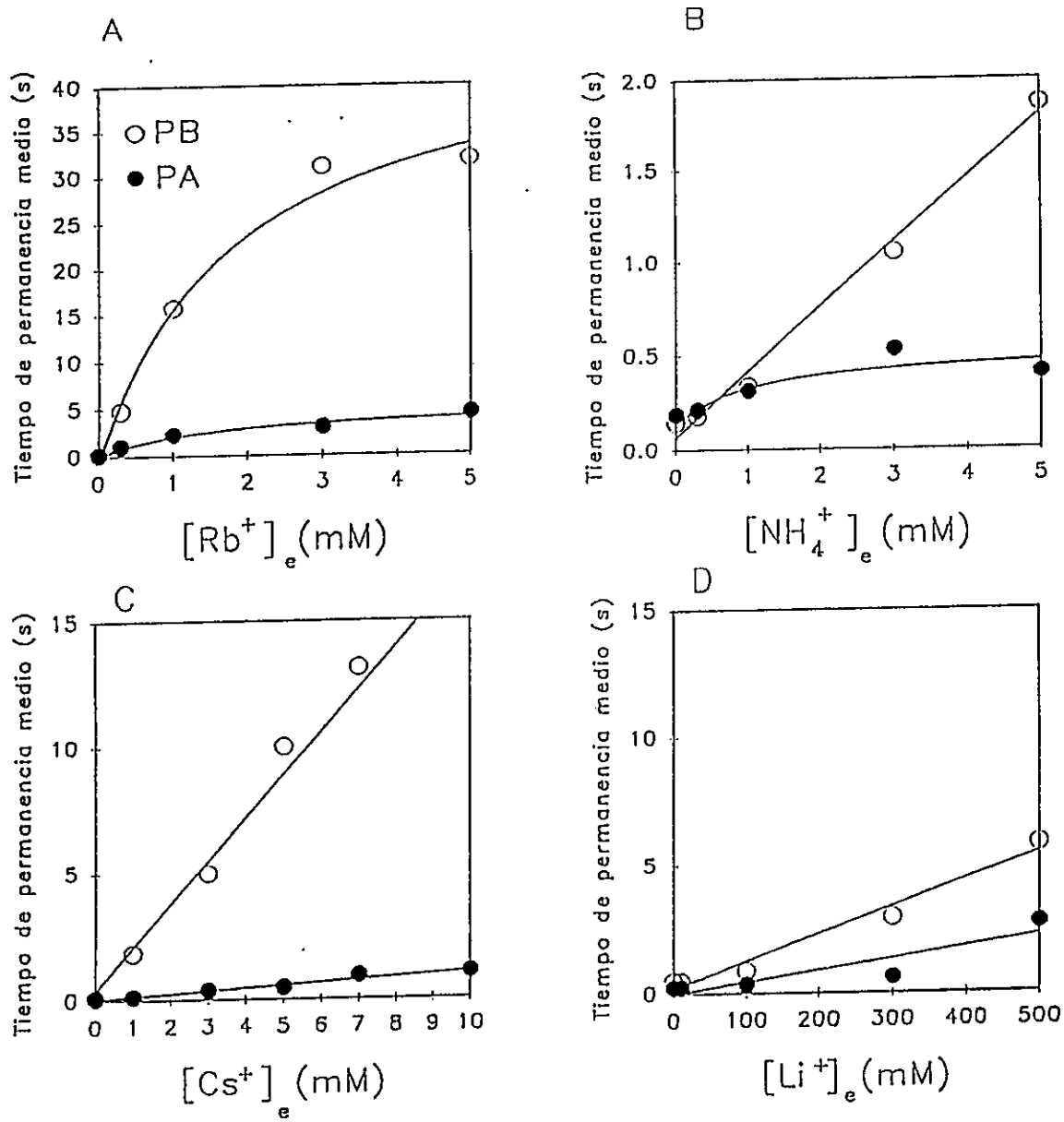


FIGURA 6

FIGURA 6

Duración de los PA y PB en función de la concentración de cationes monovalentes externos.

Los τ_{PA} y τ_{PB} en cuatro canales distintos. Las condiciones iónicas impuestas a los canales fueron las mismas que para el canal de la figura 2, con la excepción que se reemplazó al K^+ por cationes permeables (Rb^+ (A) y NH_4^+ (B)) y no permeables (Cs^+ (C) y Li^+ (D)). Los círculos blancos corresponden a los τ_{PB} y los círculos negros corresponden a los τ_{PA} . Los puntos correspondientes a los cationes permeables son ajustados con las ecuaciones 3 y 4, con excepción de los PB con amonio externo, mientras que los puntos correspondientes a los cationes no permeables son ajustados con las ecuaciones 5 y 6.

TABLA 2

	α_1 (s ⁻¹ M ⁻¹)	α_2 (s ⁻¹ M ⁻¹)	K_1 (mM ⁻¹)	β_1 (s ⁻¹)	β_2 (s ⁻¹)	K_2 (mM ⁻¹)	α_1/α_2	β_1/β_2
Rb ⁺	3*10 ⁷	9.6*10 ⁵ ±1.5*10 ⁵	22 ±6.7	4.43	0.02 ±3*10 ⁻³	108 ±23	34	221
Cs ⁺	3*10 ⁷	0	0.58 ±0.2	4.43	--	9.1 ±1.1	--	--
Li ⁺	3*10 ⁷	0	0.03 ± 0.03	4.43	--	0.05 ± 0.01	--	--
NH ₄	3*10 ⁷	9.3*10 ⁶ ±3*10 ⁶	3.15 ±4.2	4.43	--	1.35 ± 0.9	3.5	--
TEA	3*10 ⁷	0	7.14 ± 3.9	4.43	--	20.3 ± 8.7	--	--

Parámetros cinéticos y de equilibrio que determinan el bloqueo por el ión Ba⁺². Los cationes de la izquierda son agregados en el lado externo. Los parámetros α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , K_1 y K_2 (las últimas dos son constantes de asociación), fueron obtenidos ajustando las ecuaciones 3 y 4 (en página 29) a los datos experimentales mostrados en las figuras 6A-D (curvas continuas). Las constantes de asociación de Ba⁺² en ausencia ($K_a^1 = \alpha_1/\beta_1$) y en presencia ($K_a^2 = \alpha_2/\beta_2$) de un cation externo fueron: Para K⁺ : K_a^1 : 7*10⁶ M⁻¹; K_a^2 : 4*10⁶ M⁻¹ (en tabla 1) y para Rb⁺ : $K_a^1 = 7*10^6$ M⁻¹; $K_a^2 = 4.8*10^7$ M⁻¹. En el resto no fue determinado. Media ± desviación estandar.

Los τ_{PA} para el ion NH_4^+ presentan también una saturación como los que presentan Rb^+ y K^+ , sin embargo los τ_{PB} fueron mejor ajustados con una recta, debido a que probablemente se necesitan de concentraciones más altas para alcanzar la saturación. (figura 6B).

Al ajustar los valores experimentales de Cs^+ y Li^+ con las ecuaciones 3 y 4, los τ_{PA} y τ_{PB} son ajustados con líneas rectas, lo que supone a pesar de usar altas concentraciones del catión, estas fueron insuficientes para lograr la saturación de las curvas. Durante el ajuste con las ecuaciones 3 y 4 las constantes de rapidez α_2' y β_2 se hacen muy pequeñas o cercanas a cero. Un reordenamiento de las ecuaciones 3 y 4 tomando en cuenta esta última consideración, da como resultado:

$$\tau_{PA} = (1/\alpha_1') + (K_1/\alpha_1') [M] \quad (5)$$

$$\tau_{PB} = (1/\beta_1) + (K_2/\beta_1) [M] \quad (6)$$

Las ecuaciones 5 y 6 son casos particulares del modelo R3, cuando la concentración de M es baja. Estas ecuaciones describen rectas con interceptos $1/\alpha_1'$ y $1/\beta_1$ y pendientes (K_1/α_1') y (K_2/β_1) respectivamente (Ver apéndice).

Al observar las secuencias de selectividad en R5, se observa que la magnitud de los valores de las constantes de asociación (K_1) en ausencia de Ba^{+2} incrementan en presencia del catión divalente (K_2), lo que significa que el catión unido al sitio externo es afectado por el ion Ba^{+2} aumentando su afinidad por el sitio externo pero no siente una repulsión electrostática desde el catión divalente.

E. TEA COMO SONDA DEL SITIO EXTERNO

El Tetraetilamonio (TEA) es un catión orgánico que bloquea el canal de K^+ *shaker* de la *Drosophila* (MacKinnon y Yellen 1990). El bloqueo lo hace coordinándose con thr (en posición 449) ubicadas en la boca externa del canal. Recientemente, en K_{Ca} de *Drosophila* (*Slowpoke*), se han mutado los residuos de Thr (que forman el sitio de unión) por Tyr y se han hecho estudios de inhibición por TEA externo en canales que contienen 3, 2, 1 o 0 Tyr en la boca del canal. El grado de inhibición permitió determinar la naturaleza tetramérica del canal *Slowpoke* (Shen y cols. 1994).

Sabemos que el TEA se une al vestíbulo externo del canal, pero es posible que su sitio de unión corresponda o al menos afecte por su cercanía al sitio de unión de cationes externos en el canal K_{Ca} . Por esta razón, usamos al TEA^+ como una posible sonda del sitio externo dentro del poro.

La **figura 7A** muestra un registro control con algunos bloqueos por Ba^{+2} contaminante. Al agregar 200 nM de Ba^{+2} interno (0 μM TEA^+ externo) se observa una mayor frecuencia de aparición de los bloqueos. Al incrementar en forma progresiva la concentración de TEA externo, se observa un incremento en la duración de los PA y los PB. La **figura 7B** muestra que los valores para los τ_{PA} y los τ_{PB} que son ajustados con las ecuaciones 3 y 4 resultaron ser líneas rectas. Este ajuste supone que las concentraciones usadas son insuficientes como para producir la saturación. Las concentraciones usadas variaron desde 0 a 800 μM de TEA^+ y la conductancia se vió disminuida en más de un 60%.

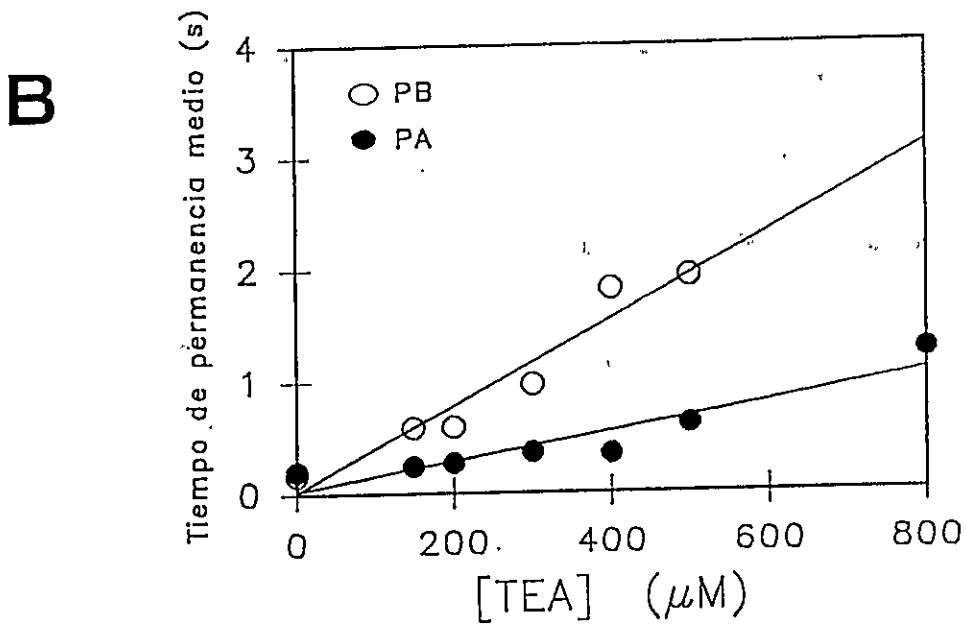
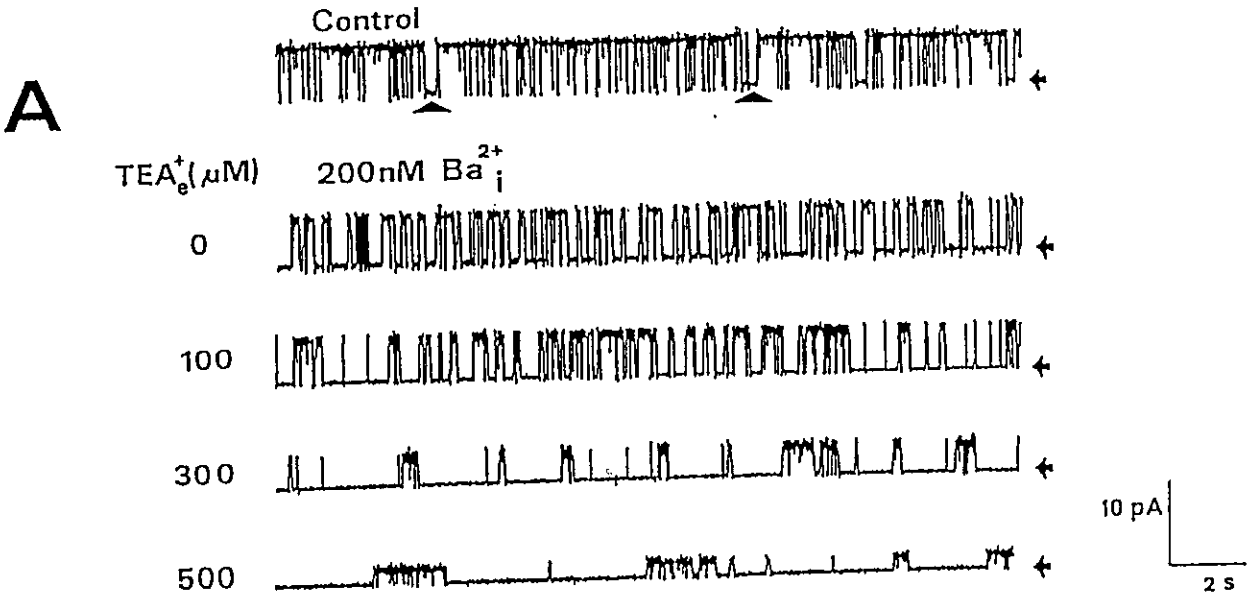


FIGURA 7

FIGURA 7

Efecto inducido por TEA sobre los PA y los PB

A) Las condiciones iónicas usadas son las mismas descritas para el canal de la figura 2. El primer registro muestra el control con K^+ y Ba^{+2} contaminantes. Las cabezas de flechas indican los bloqueos inducidos por el Ba^{+2} a concentraciones contaminantes. El segundo registro se halla en presencia de Ba^{+2} agregado en el lado interno del canal. TEA 0 mM indica que no se agregó bloqueador a la solución externa. En los registros siguientes se agregó concentraciones crecientes de TEA.

B) El gráfico muestra la duración de los τ vs [TEA]. Los círculos blancos y negros corresponden a la duración de los periodos bloqueados y activos respectivamente. Suponiendo que TEA se une al sitio externo, los puntos experimentales fueron ajustados con rectas usando las ecuaciones 3 y 4. Alternativamente como caso particular se pueden usar las ecuaciones 5 y 6 (pag.35).

En un modelo donde el canal conduce o es bloqueado por TEA⁺ la corriente promedio del canal $\langle I \rangle$ en presencia del TEA⁺ esta dado por la siguiente ecuación:

$$I_0 / \langle I \rangle = (1 + [\text{TEA}] / K_d), \quad (7)$$

donde I_0 es la corriente del canal en ausencia de TEA y K_d es la constante de disociación aparente. La **figura 8** muestra una $K_d = 0.28$ mM. Este resultado revela, que el sitio al que se ha unido el TEA para incrementar los τ_{PA} y τ_{PB} es semejante al que se ha unido clásicamente en la literatura (Vergara y cols., 1984; Yellen 1984; Villarroel 1986). Al ajustar los datos con las ecuaciones 3 y 4 se generan los valores de la última fila en la tabla 2. Según estos valores, la K_d (el valor inverso de K_1) para TEA en ausencia de Ba⁺² es de 0.14 mM, cercano a los 0.28 mM calculado desde las razones de corrientes en ausencia y en presencia de TEA.

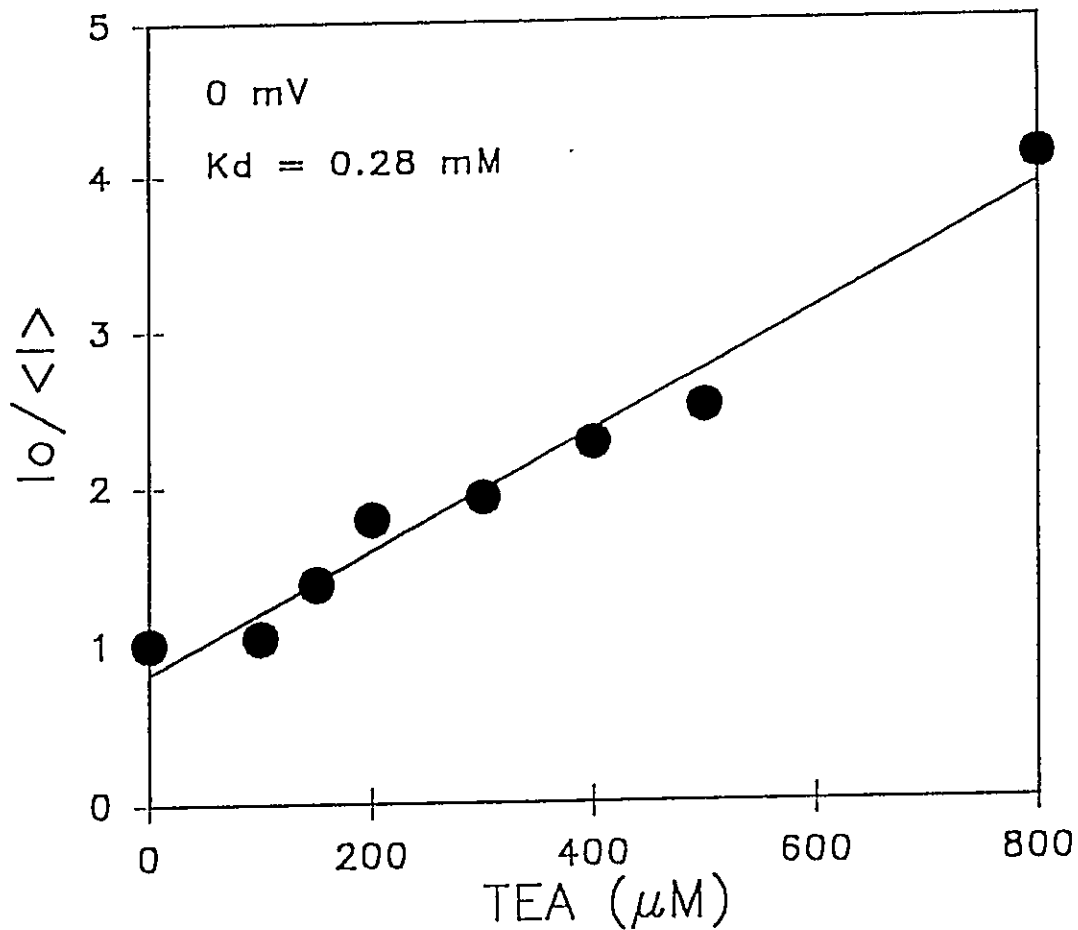


FIGURA 8

Obtención de la constante de disociación de TEA de su sitio de bloqueo

La expresión de la probabilidad de apertura en función de las constantes de rapidez de primer y segundo orden, da como resultado la ecuación 7. La pendiente de esta curva tiene el valor de $1/K_d$, de donde se obtiene la constante de disociación. El potencial aplicado fue de 0 mV. Usando la ecuación $I/I_0 = 1/(1 + ([\text{TEA}]/K_d)^N)$, se obtiene un $N(\text{de Hill})=0.89$.

F. EL EFECTO DEL POTENCIAL ELECTRICO SOBRE EL SITIO EXTERNO, REVELA LA EXISTENCIA DE UNA BARRERA EXTERNA.

La **figura 9** muestra los registros de un canal a distintos potenciales aplicados en un intervalo de 80 mV (-40 a +40 mV). En el registro se puede observar como varía la duración de los PA y los PB en ausencia de cationes monovalentes externos. Las duraciones de los τ_{PA} y τ_{PB} decrecen exponencialmente al cambiar el potencial con una variación de e veces cada 30 mV (**figura 10A**). Particularmente, de la figura 10A se deduce que a potenciales más despolarizantes la constante de disociación del ion Ba^{+2} se va haciendo mayor (disminuye τ_{PB}). Estos resultados son válidos también para 1 mM Cs^+ (**figura 10B**). Una forma de interpretar estos resultados esta esquematizada en forma de un perfil de energía hipotético en la **figura 10C**. El perfil de energía hipotético, es el que siente el ion Ba^{+2} cuando entra al poro del K_{Ca} en presencia y en ausencia de un potencial externo aplicado. Cuando no hay un catión monovalente unido en el lado externo del poro, el ion Ba^{+2} disocia por ambos lados: *cis* y *trans*. Cuando el sitio externo está ocupado, la barrera externa se hace infinitamente grande, bloqueando la salida del Ba^{+2} por ese lado del canal. En ausencia de un catión externo y la aplicación de un potencial despolarizante al lado *cis*, se produce una disminución de la barrera externa de tal modo que hace más fácil la salida del ion Ba^{+2} por el lado *trans*.

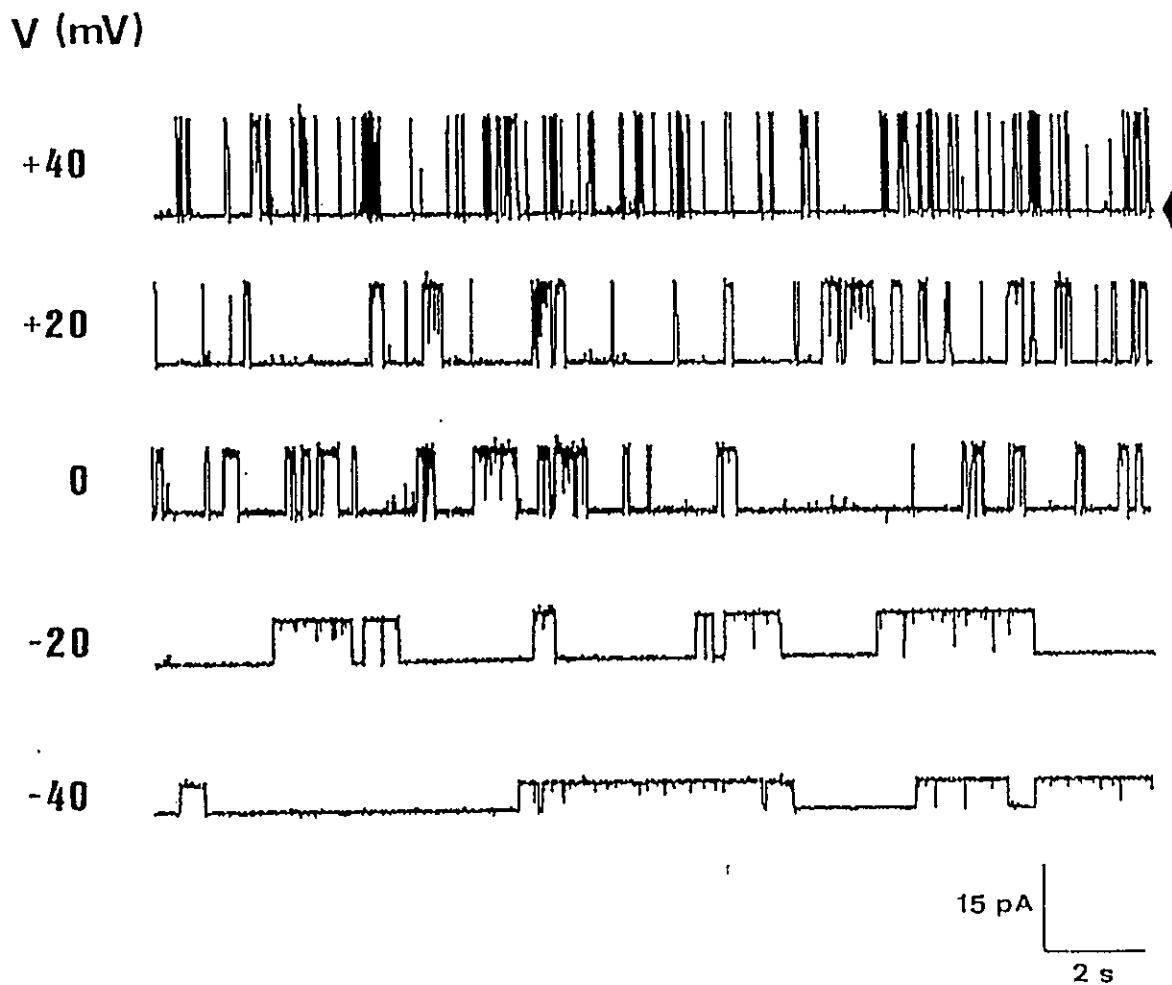


FIGURA 9

Registros de canal único a diferentes potenciales

Dependencia de potencial de los PA y de los PB. Las condiciones iónicas son las mismas descritas en la figura 2. El registro se hizo en ausencia de un catión monovalente externo, con excepción de NMDG del amortiguador. La cabeza de flecha en la primera fila indica el estado cerrado.

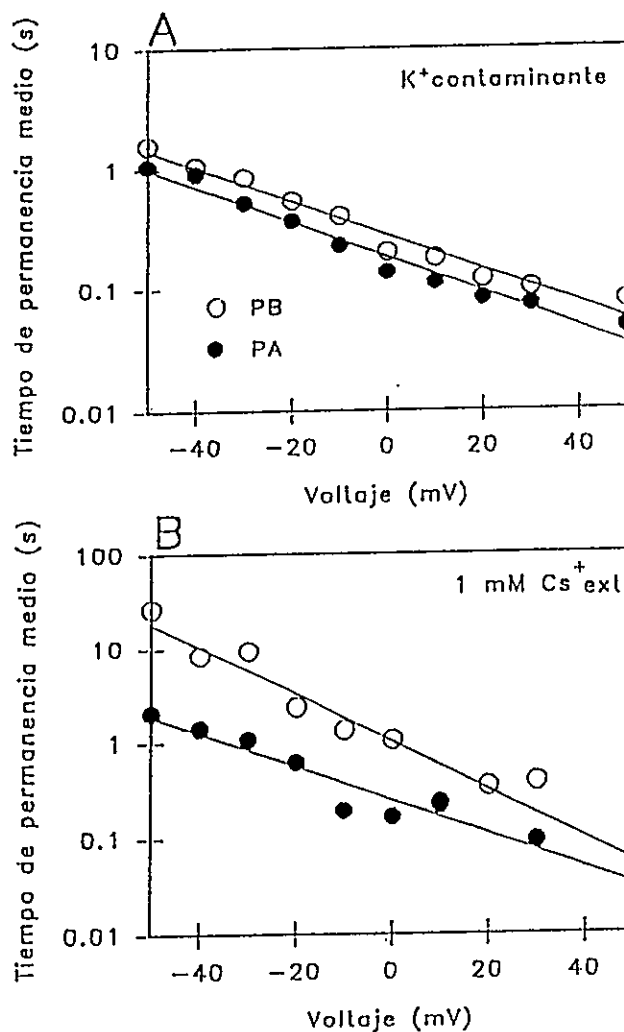
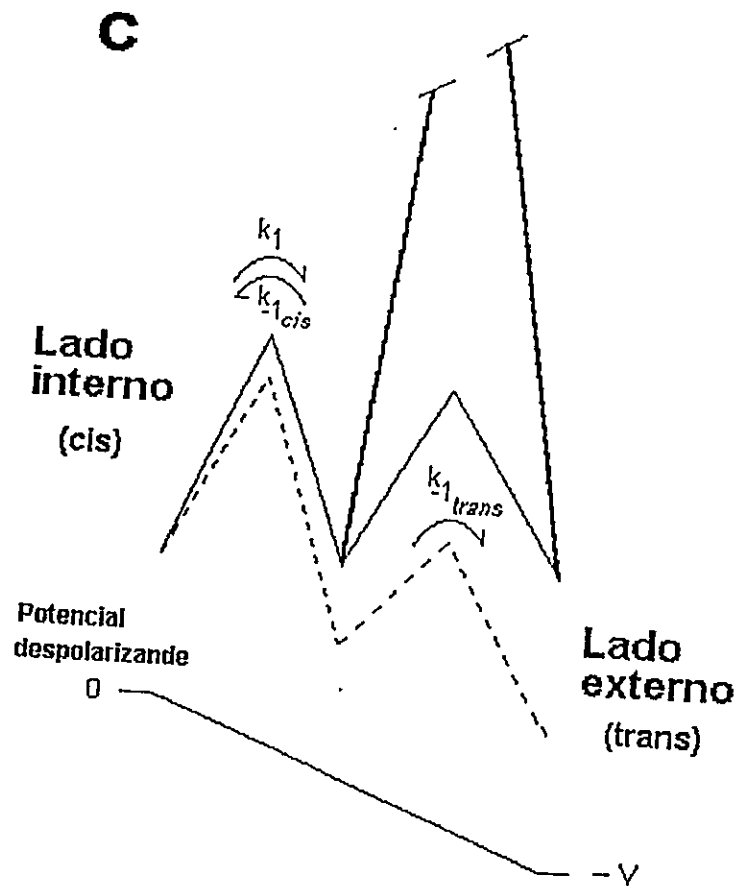


FIGURA 10

Gráfico de los tiempos de permanencia v/s voltaje.

10A) Gráfico del registro de la figura 9. La duración de los τ_{PA} y τ_{PB} caen hacia potenciales más despolarizantes e veces por cada 30 mV en presencia de K^+ contaminante. Para los PB, la distancia eléctrica efectiva ($z\delta$) fue de 0.84 y la constante de disociación en equilibrio a $V=0$ (K_0) fue de 3.59 s^{-1} . Para los PA, $z\delta = 0.86$ y $K_0 = 5.44 \text{ s}^{-1}$. La ecuación usada para hacer el ajuste fue: $\tau = (k_0 \times \exp(z\delta FV/RT))^{-1}$.

10B) Con 1 mM de Cs^+ externo, la dependencia de potencial de τ_{PA} y τ_{PB} fue de e veces cada 52 mV y 37 mV respectivamente, similar a la dependencia de potencial para el gráfico A. Para los PB, $z\delta = 1.5$ y $K_0 = 0.99 \text{ s}^{-1}$ y para los PA, $z\delta = 0.8$ y $K_0 = 2.98 \text{ s}^{-1}$.



10C) Perfil hipotético para el Ba^{+2} que entra al poro bajo distintas condiciones. La línea delgada continúa, indica el perfil en ausencia de un catión externo (gráfico 10A). La línea punteada, indica la aplicación de un potencial despolarizante en el lado *cis*, esto permite incrementar el componente *trans* de k_{-1} , permitiéndole al Ba^{+2} salir más fácilmente por ese lado del canal. Simultáneamente incrementa k_1 y esto se refleja en el comportamiento paralelo de los τ vs V (gráfico 10A). La línea gruesa continua, muestra el perfil de energía a 0 mV aplicado y en presencia de un catión unido al sitio externo.

G. INCREMENTO EN LOS τ_{PA} Y LOS τ_{PB} AL VARIAR EL K^+ INTERNO.

Con la finalidad de ver si existe alguna simetría en la vía de conducción del K_{Ca} de músculo liso, llevamos a cabo el experimento inverso, es decir, se dejó esta vez constante el K^+_{ext} (150 mM) y se varió el K^+_{int} . Las **figuras 11A y 11B** muestran los datos experimentales obtenidos a una concentración de 100 μ M de Ba^{+2} externo, 500 veces mayor que la usada en los experimentos previos (200 nM de Ba^{+2} interno). Estos datos muestran que a concentraciones crecientes de K^+_{int} , el comportamiento cualitativo (saturación) de los τ_{PA} y los τ_{PB} fue similar a la observada desde el lado externo.

En la **tabla 3** se muestran los parámetros cinéticos y en equilibrio para dos de los cationes capaces de atravesar el canal. De este cuadro podemos obtener la secuencia de selectividad del sitio interno según las constantes de asociación en mM^{-1} en ausencia (K_1) y en presencia (K_2) de Ba^{+2} :

$$K_1: Rb^+(7.14) > K^+(1.31) \quad (R6)$$

$$K_2: K^+(0.12) > Rb^+(0.02)$$

En ausencia de Ba^{+2} las K_1 son del orden de aquellas medidas desde el sitio externo (R5 en pag.31), lo que sugiere que el sitio interno posee una afinidad ligeramente mas baja que la del sitio externo. En cambio en presencia de Ba^{+2} adentro del poro, las K_2 para el sitio interno se hacen notoriamente menores, lo que sugiere que la afinidad del sitio periférico interno se ve fuertemente reducida, probablemente porque el sitio interno está mucho más cercano al sitio de Ba^{+2} de lo que está el sitio externo y por lo tanto un catión unido al sitio interno, puede "sentir" mas fuertemente al Ba^{+2} a través de una repulsión electrostática.

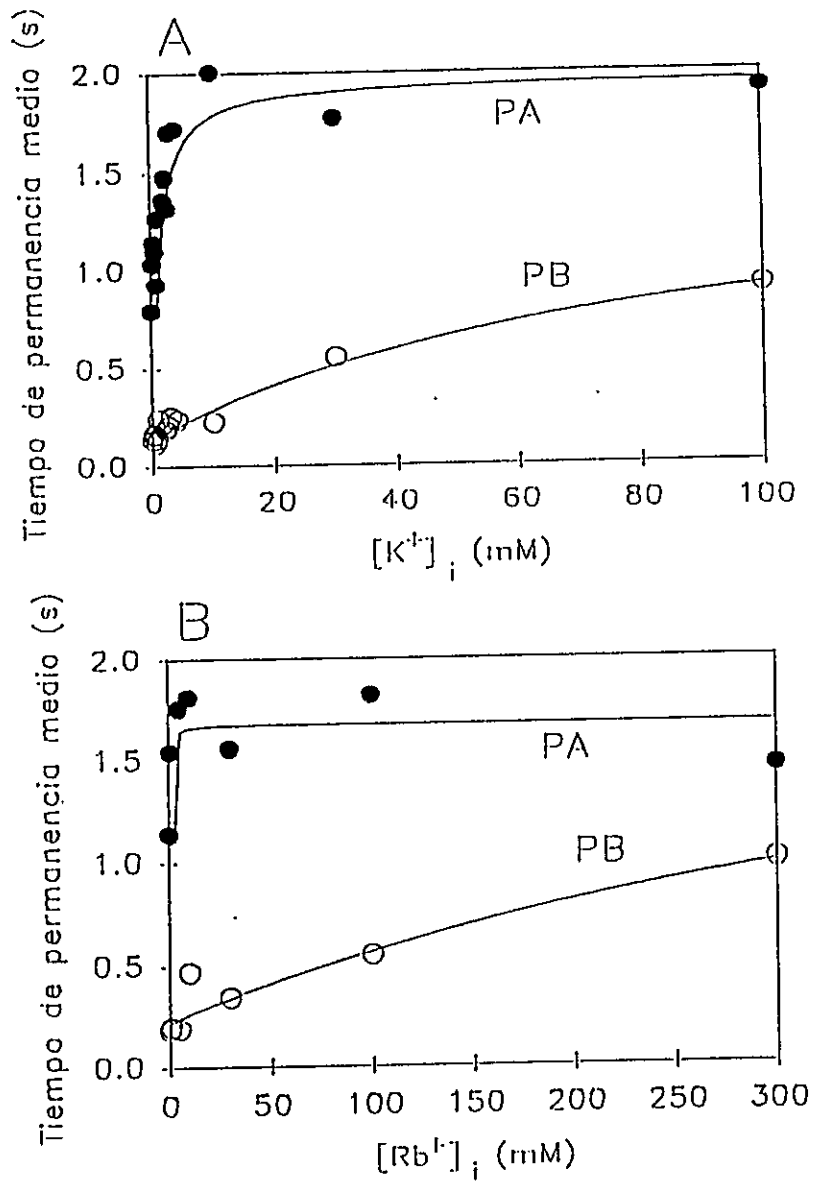


FIGURA 11

Los cationes agregados en el lado interno del poro bloquean asimétricamente la salida del ion Ba^{+2} . La concentración externa de Ba^{+2} fue de $100 \mu M$. Al incrementar la concentración de un catión permeable en el lado interno se observa una saturación semejante a lo que ocurre en la figura 4. Sin embargo se requieren concentraciones mucho más elevadas, por lo menos 20 veces más grandes (para el caso de K^+). (A) muestra las curvas saturantes debido al K^+ agregado, (B) muestra las curvas debido al Rb^+ agregado.

TABLA 3

	α_1 (s ⁻¹ M ⁻¹)	α_2 (s ⁻¹ M ⁻¹)	K ₁ (mM ⁻¹)	β_1 (s ⁻¹)	β_2 (s ⁻¹)	K ₂ (mM ⁻¹)	α_1/α_2	β_1/β_2
K ⁺	1.2*10 ⁴ ±1.5*10 ³	0.5*10 ⁴ ±2.7*10 ²	1.31 ± 0.6	6.4 ± 0.6	0.64 ± 0.1	0.12 ± 0.03	2.4	10
Rb ⁺	0.9*10 ⁴ ±1.3*10 ³	0.6*10 ⁴ ±6*10 ³	7.14 ± 17	4.24 ± 1	0.46 ± 0.4	0.02 ± 0.01	1.6	9.2

Parámetros cinéticos y en equilibrio que determinan el bloqueo por Ba⁺². Los cationes de la izquierda son agregados en el lado interno. Los parámetros α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , K₁ y K₂ son obtenidos al ajustar las ecuaciones 5 y 6 (en pagina 35) a los datos experimentales mostrados en la figura 11 (curvas continuas). Para ajustar los datos, todos los parámetros se dejaron variables. Las constantes de asociación de Ba⁺² en ausencia ($K_a^1 = \alpha_1/\beta_1$) y en presencia ($K_a^2 = \alpha_2/\beta_2$) de un catión unido al sitio interno fueron: Para K⁺: $K_a^1 = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $K_a^2 = 7.8 \times 10^3$ y para Rb⁺: $K_a^1 = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $K_a^2 = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Media ± desviación estandar.

DISCUSIÓN

A. INTERPRETACIÓN FÍSICA DE LAS CONSTANTES DE RAPIDEZ

Un valor límite en los valores de τ_{PB} a altas concentraciones de un catión permeable, lo interpretamos de la siguiente manera: en ausencia de un catión externo, el Ba^{+2} tiene una constante de rapidez de salida alta, con un componente hacia el lado *trans* y otro componente hacia el lado *cis*. A ésta constante de salida con dos componentes podemos llamarla una constante de rapidez de salida máxima,

$$k_{off,max} = (k_{trans} + k_{cis}).$$

Esta $k_{off,max}$ corresponde al intercepto con la ordenada ($1/\beta_1$ en **figura 5C**). Al incrementar la concentración externa del catión capaz de atravesar el canal, incrementa la ocupación del sitio externo y el componente *trans* de la constante de salida $k_{off,max}$ de Ba^{+2} , se acerca a cero. A esta nueva constante la llamaremos una constante de rapidez de salida mínima o $k_{off,min}$.

$$k_{off,min} = (k_{cis}).$$

Esta constante de salida mínima define la asíntota observada ($1/\beta_2$ en **figura 5C**). La salida de Ba^{+2} por el lado interno se ve facilitada, porque el sitio interno tiene menor afinidad por el catión que el sitio externo. Esta idea se deriva de las secuencias de selectividad, donde las constantes de asociación de los cationes unidos por el lado interno (R6) son más afectadas que las constantes de asociación de los cationes unidos por el lado externo (R5).

Esto sugiere que la menor afinidad de un catión por el sitio interno, puede ser reflejo entre otros factores de una mayor interacción electrostática con el Ba^{+2} unido adentro del poro.

La ausencia de un límite superior para los cationes que no atraviesan el canal se explica porque el ajuste de los datos a las ecuaciones 3 y 4, predice que las constantes de rapidez α_2 y β_2 son muy pequeñas y esto se produce a bajas concentraciones del cation que son insuficientes para saturar la respuesta.

El intercepto para los τ_{PA} , lo interpretamos como que en ausencia de un catión externo, la constante de rapidez de entrada de Ba^{+2} interno es máxima ($1/\alpha_1'$ en **figura 5B**) y la llamaremos $k_{on,max}$ (los datos en la **tabla 1**, indican que la presencia de un catión unido al sitio externo dificulta la entrada del ion Ba^{+2}). El valor límite observado con los τ_{PA} a altas concentraciones de un catión externo, se debe al alto grado de ocupación que el catión tiene en el sitio y que impide la entrada del Ba^{+2} por un posible efecto de repulsión electrostática (disminuye el k_1 en fig. 1 y fig. 10C). Esta dificultad para la entrada llega a un valor límite $1/\alpha_2'$ y la llamaremos $k_{on,min}$.

En el caso de los cationes que no atraviesan el canal, ellos incrementan los τ_{PA} por ocupación del sitio externo pero a concentraciones mucho más elevadas.

B. INTERPRETACION DEL MODELO EN BASE A SUS PARAMETROS CINÉTICOS Y DE EQUILIBRIO.

De los parámetros cinéticos y de equilibrio del modelo R3 podemos obtener información diversa y que se resume a continuación:

(a) *Las constantes de rapidez de entrada y de salida del ion Ba^{+2} desde el canal en ausencia y en presencia de K^+ :*

En ausencia de K^+_{ext} la constante de rapidez de entrada aparente de bario α_1' es 6.67 s^{-1} ($3.3 \times 10^7 * 200 \times 10^{-9}$) y la de salida de bario β_1 es 4.43 s^{-1} . En ausencia de K^+_{int} , α_1' es 1.2 s^{-1} ($1.2 \times 10^4 * 100 \times 10^{-6}$) y β_1 es 6.4 s^{-1} . Por otro lado, en presencia de K^+_{ext} , α_2' es 0.08 s^{-1} ($4 \times 10^5 * 200 \times 10^{-9}$) y β_2 es 0.1 s^{-1} . En presencia de K^+_{int} , α_2' es 0.5 s^{-1} ($0.5 \times 10^4 * 100 \times 10^{-6}$) y β_2 es 0.64 s^{-1} . Estos datos muestran que en ausencia de K^+ externo o interno, las constantes de entrada y salida de Ba^{+2} son mayores que en presencia de K^+ , lo que puede interpretarse como la existencia de una interacción electrostática entre los cationes unidos a los sitios externo e interno y el catión divalente, y que afecta las constantes de rapidez del ión Ba^{+2} .

Las razones α_1/α_2 indican la magnitud relativa con que el ion Ba^{+2} entra al canal en ausencia de un cation monovalente en relación a la presencia del mismo catión adentro del poro. Con K^+_{ext} variable la razón α_1/α_2 es 75 y con K^+_{int} variable la razón α_1/α_2 es 2.4, lo que sugiere que la barrera electrostática que encuentra el Ba^{+2} interno en presencia de K^+_{ext} es mayor (entra 75 veces más lento) que en ausencia de K^+_{ext} (entra 75 veces más rápido) y la

barrera electrostática que encuentra el Ba^{+2} externo en presencia de K^+_{int} es menor (entra sólo 2.4 veces más rápido) que en ausencia de K^+_{int} . Las razones β_1/β_2 indican la magnitud relativa con que el ion Ba^{+2} sale del canal en ausencia de un catión monovalente en relación a la presencia del mismo catión adentro del poro. Con K^+_{ext} variable la razón β_1/β_2 es 44 (el bario sale 44 veces más rápido en ausencia de potasio externo) y con K^+_{int} variable la razón β_1/β_2 es 10 (el Ba^{+2} sale sólo 10 veces más rápido en ausencia de K^+_{int}). Esto sugiere que el Ba^{+2} que ya está adentro del poro, en ausencia de K^+_{ext} , le es más fácil salir por el lado externo que por el lado interno y por lo tanto supone que la barrera externa es menor que la barrera interna (**figura 12**).

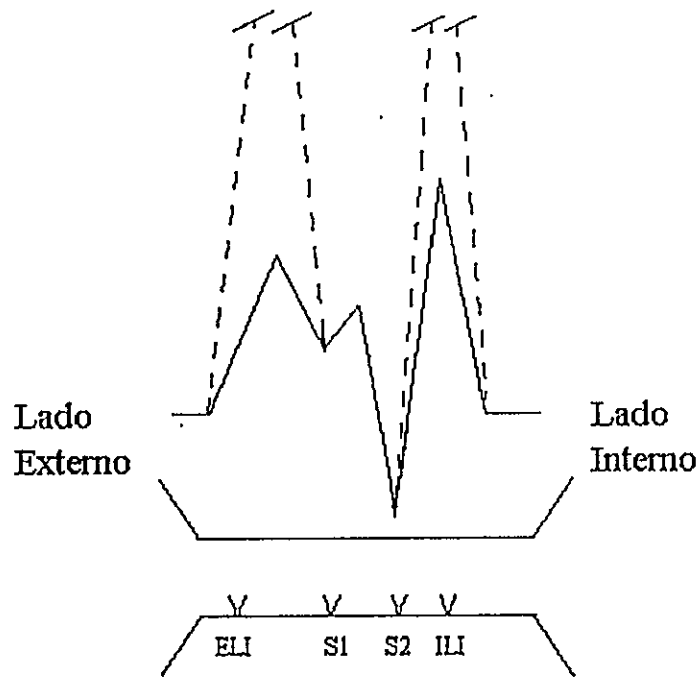


FIGURA 12

Perfil de energía hipotético que siente el Ba^{+2} en un modelo físico con dos sitios de unión. Como el Ba^{+2} que está adentro del poro sale 44 veces más rápido en ausencia de K^+_{ext} y sólo 10 veces más rápido en ausencia de K^+_{int} , podemos deducir que la barrera externa es menor que la barrera interna (línea continua). Las barreras en los extremos del poro, pueden hacerse muy grandes cuando estos sitios son ocupados por algún catión monovalente (línea discontinua). En la parte inferior del perfil se esquematiza un poro con la ubicación hipotética de los sitios de unión para Ba^{+2} y para los cationes externos e internos. Los sitios S1 y S2 unen al Ba^{+2} con distintas afinidades [$S2 > S1$] (Ver modelo físico propuesto en pagina 56).

(b) *Las afinidades del ion K^+ en presencia y ausencia de Ba^{+2} :*

La constante en equilibrio de asociación (afinidad) de K^+_{ext} al canal en ausencia de Ba^{+2} (K_1) fue de 8.4 mM^{-1} y en presencia de Ba^{+2} (K_2) fue de 16.7 mM^{-1} , es decir, en presencia de Ba^{+2} la afinidad de potasio externo aumenta 2 veces ($K_2/K_1=2$). Por otro lado la constante de asociación de K^+_{int} al canal en ausencia de Ba^{+2} (K_1) fue de 1.31 mM^{-1} y en presencia de Ba^{+2} (K_2) fue de 0.12 mM^{-1} , es decir, en presencia de Ba^{+2} la afinidad de K^+_{int} disminuye 11 veces ($K_2/K_1=0.09$). Los resultados permiten sugerir que la unión de K^+ al sitio externo no es debilitada por la presencia de Ba^{+2} al interior del poro. Por el contrario, ocurre un incremento en la constante de asociación observada la que podría ser explicada por pequeños cambios conformacionales en el poro inducidos por el ion Ba^{+2} . Estos cambios de conformación inducidos a nivel del poro no son raros, ya que existen antecedentes previos de que la ocupación de algunos sitios al interior del canal, inducen cambios en el "gating", entre ellos el ion Ba^{+2} es capaz de desestabilizar el estado cerrado-bloqueado y cambiar el equilibrio hacia el estado abierto-bloqueado (Miller y cols., 1987). Los resultados con K^+_{int} variable sugieren que el K^+_{int} interacciona fuertemente con el ion Ba^{+2} y por eso disminuye 11 veces la afinidad de K^+ por el sitio interno. Estos resultados nos sirven de evidencia para proponer que la posición del sitio interno está más cercana al sitio de Ba^{+2} que la posición del sitio externo. Nuestra evidencia esta de acuerdo con el modelo de posición relativa de los sitios determinada por Neyton y Miller, 1988b en base al calculo de las distancias eléctricas. Neyton calculó que el sitio externo tenia un $\delta=0.15$, el sitio interno un $\delta=0.7$, mientras que el sitio denominado "enhancement site" estaba en un

$\delta=0.5$ y por lo tanto el sitio de unión de Ba^{+2} debía estar entre 0.5 y 0.7.

En ausencia de Ba^{+2} adentro del poro, la afinidad por K^+ del sitio externo ($K_1=8.4$ mM⁻¹ en tabla 1; $K_d=119$ μ M) es mayor que la del sitio interno ($K_1=1.31$ mM⁻¹ en tabla 3; $K_d=763$ μ M), lo que sugiere que la afinidad intrínseca (en ausencia de otros cationes) del sitio externo por el ion K^+ es mayor que la del sitio interno. Es posible que esta mayor afinidad por K^+ del sitio externo, explique en parte el origen de la barrera externa.

(c) *Las afinidades del ion Ba^{+2} en ausencia y en presencia de K^+ :*

Para tener una estimación de la capacidad de disociación del ion Ba^{+2} desde un supuesto sitio adentro del poro, se analizaron las constantes de disociación de Ba^{+2} en ausencia de K^+ ($K_d^1=\beta_1/\alpha_1$) y en presencia de K^+ ($K_d^2=\beta_2/\alpha_2$). Con K^+_{ext} variable la K_d^1 fue 0.15 μ M y la K_d^2 fue 0.25 μ M. Con K^+_{int} variable la K_d^1 fue de 0.5 mM y la K_d^2 fue de 0.13 mM. Los datos indican que la capacidad del ion Ba^{+2}_{ext} de disociarse no es afectada por el K^+_{int} y que tampoco la capacidad del ion Ba^{+2}_{int} es afectada por el K^+_{ext} . Sin embargo, la afinidad del ion Ba^{+2} es mayor (menor K_d) cuando el catión divalente es adicionado en el lado interno (K_d a nivel de μ M) que cuando es adicionado en el lado externo del canal (K_d a nivel de mM). Según lo observado anteriormente en (a), sólo las constantes de rapidez y no las afinidades por Ba^{+2} son afectadas por K^+ . A la búsqueda de un ejemplar físico apropiado, propusimos un modelo de poro consistente con las observaciones experimentales (figura 12) y que será explicado más adelante.

Usando las constantes de asociación del ion Ba^{+2} al canal en ausencia de K^+

$(K_a^1 = \alpha_1 / \beta_1)$ y en presencia de K^+ ($K_a^2 = \alpha_2 / \beta_2$) y utilizando las constantes de asociación de K^+ en ausencia (K_1) y en presencia (K_2) de Ba^{+2} , podríamos verificar la relación de reversibilidad microscópica para el modelo de la figura 5A. Para un modelo cíclico se debería cumplir el principio de reversibilidad microscópica, que consiste en que en el equilibrio, cualquier proceso molecular se produce a la misma velocidad que el inverso de ese proceso. Este principio supone que el sistema cuyo equilibrio está ligeramente perturbado puede describirse estadísticamente casi de la misma forma que el que se encuentra en equilibrio. En este caso, el modelo debería satisfacer la relación $K_1 \times K_a^1 = K_2 \times K_a^2$. Para K_{ext}^+ variable, si $K_1 = 8.4 \text{ mM}^{-1}$, $K_2 = 16.7 \text{ mM}^{-1}$ y $K_a^1 (3 \times 10^7 / 4.43) = 6.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, entonces la ecuación de reversibilidad predice un $K_a^2 = 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Según el cálculo directo desde la razón $\alpha_2 / \beta_2 (4 \times 10^5 / 0.1)$ se obtiene un $K_a^2 = 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, un valor que concuerda con el de la ecuación y por lo tanto se cumple el principio de reversibilidad. Al contrario, con K_{int}^+ variable, la relación no se cumple. La contradicción que se encuentra al no cumplirse el principio de reversibilidad, puede ser explicado por la existencia de constantes que llevan alguna incerteza, como es el hecho que las constantes K_1 , K_a^1 y K_a^2 sean sólo constantes de pseudoequilibrio debido a que el K_{ext}^+ no está en equilibrio verdadero con el K^+ del medio externo, ya que este ion es capaz de permear el canal. Además el Ba^{+2} unido tampoco está en equilibrio verdadero con el Ba^{+2} interno, ya que el Ba^{+2} también es capaz de permear el canal. También, el hecho de que la salida de Ba^{+2} tenga dos componentes (*cis* y *trans*), que varían de acuerdo a las condiciones iónicas impuestas al canal, hace que el valor real de la constante β_1 no pueda ser determinada con exactitud.

C. MODELO FISICO PROPUESTO

Considerando que existen varios sitios de unión adentro del poro, supusimos que el ion Ba^{+2} puede ocupar dos posiciones, sitio 1 (S1) y sitio 2 (S2) dentro de la via de conducción y cada uno de ellos posee una afinidad distinta por el ion bario (**figura 12**). El sitio S1 ($K_d^1=0.5$ mM) es el más cercano al sitio de unión de cationes externos y el sitio S2 ($K_d^1=0.15$ μ M) es el más cercano al sitio de unión de cationes internos. Probablemente la gran afinidad del sitio S2 puede ser explicada por la existencia de cargas negativas en las paredes del poro. Recientes estudios han mostrado la presencia de dos residuos negativos en dos canales de K_{Ca} clonados, estos aminoácidos son Glu 303 y Asp 319 en *mslo* y Asp 306 y Glu 310 en *hslo*; Butler y cols., 1993. La identidad de los sitios S1 y S2 es desconocida, sin embargo S2 puede corresponder al sitio clásico de unión a Ba^{+2} y que bloquea el K_{Ca} en músculo esquelético, mientras que S1 puede corresponder al sitio descrito como "enhancement site" (Neyton y Miller 1988b), que puede ser ocupado por K^+ solo a muy altas concentraciones y cuya ocupación acelera la salida del ion Ba^{+2} desde el sitio S2. En la **figura 12** se esquematiza un perfil de energía hipotético propuesto para el ion Ba^{+2} , con la barrera externa menor que la barrera interna y dos pozos que unen Ba^{+2} (S1 y S2), donde S2 es más profundo que S1.

En la **figura 13** se muestra un resumen de los resultados en que se determinan las afinidades del Ba^{+2} y del K^+ en distintas condiciones. En este modelo físico, el factor fundamental para que la afinidad por Ba^{+2} no sea afectada en presencia o ausencia de K^+ externo o interno es la gran afinidad por Ba^{+2} que posee el sitio S2 ($K_d^1=0.15$ μ M) y en

segundo lugar, es la distancia relativa entre los sitios ocupados por el Ba^{+2} y los sitios para K^+ . Si el sitio externo esta ocupado por K^+ , el Ba^{+2} que entra desde el lado interno ocupará preferentemente el sitio S2 (de gran afinidad) (**figura 13A**, izquierda). Igualmente, si el sitio interno esta ocupado por K^+ , el Ba^{+2} que entra desde el lado externo ocupará preferentemente el sitio S1 (**figura 13A**, derecha). Es muy probable que en el modelo fisico de la figura 13, la ocupación simultánea de ambos sitios (S1 y S2) por el ion Ba^{+2} no sea posible debido a razones electrostáticas.

La gran afinidad por Ba^{+2} de S2, hace que en ausencia de K^+ en uno de los lados del canal, la rapidez de salida de Ba^{+2} sea lenta ($4.4- 6.4 s^{-1}$; ver β_1 en tablas 1 y 3), pero más rápida que en presencia de K^+ . Además la gran afinidad por Ba^{+2} permite que sean afectadas no solo las constantes cinéticas, sino también las constantes de asociación o de afinidad de los iones K^+ en los sitios externo e interno.

El factor primordial que determina la afinidad de los iones K^+ a los sitios externo o interno es la distancia relativa entre los sitios de Ba^{+2} y los de K^+ . Si el ion Ba^{+2} ocupara el sitio S2, el K^+ más afectado será el interno (**figura 13B**, derecha) ya que está físicamente más cercano y por lo tanto siente una mayor repulsión electrostática, mientras que el K^+ externo será menos afectado (**figura 13B**, izquierda) a no ser que el Ba^{+2} ocupe el sitio S1 que esta más cercano al sitio externo pero que tiene menor afinidad.

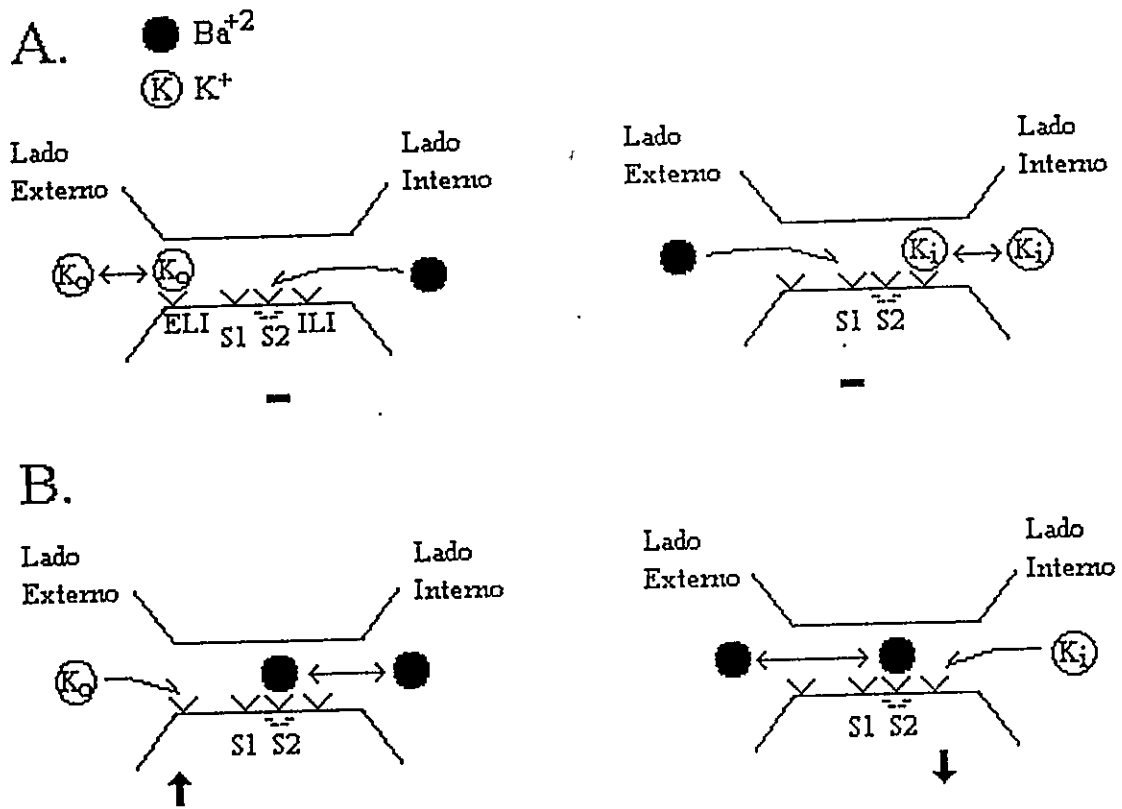


FIGURA 13

A. Afinidad de los sitios por el ion Ba^{+2} en ausencia y en presencia de K^{+} externo (izquierda) o interno (derecha). El signo - debajo del sitio indica que no hay cambios en la afinidad por Ba^{+2} en presencia o ausencia de K^{+} . Las cargas negativas en S2 indican la mayor afinidad de ese sitio respecto a S1. Los sitios denominados ELI y ILI, son los sitios externo e interno descritos por Neyton y Miller, 1988b que coinciden con los descritos en esta tesis. Las siglas vienen de la capacidad de encerrar al ion bario adentro del canal, el "External Lock-in Site (ELI)" y el "Internal Lock-in Site (ILI)". K_o y K_i son el K^{+} externo e interno respectivamente.

B. Afinidad de los sitios por el catión monovalente (K^{+}) en ausencia y en presencia de Ba^{+2} interno (izquierda) o externo (derecha). La flecha apuntando hacia arriba indica que la afinidad del sitio ELI por K^{+} no es afectada por la presencia del Ba^{+2} (al contrario, la afinidad del sitio aumenta). La flecha apuntando hacia abajo indica que la afinidad del sitio ILI por K^{+} es reducida por la presencia cercana del Ba^{+2} . Esta disminución en la afinidad puede explicarse probablemente por una fuerte interacción electrostática.

D. ¿ EL TEA INTERACTÚA CON EL SITIO EXTERNO ?

Aquellos cationes que no atraviezan el canal o que lo atraviezan sólo parcialmente, mostraron un incremento en los τ_{PA} y en los τ_{PB} sin llegar a un limite superior, estos resultados pueden ser interpretados de tres maneras:

- a) Que la sólo oclusión de la boca externa en forma de un tapón sea un factor necesario para determinar un aumento en los τ_{PA} y τ_{PB} .
- b) Que sea la interacción de TEA externo con el sitio externo (ELI), la condición necesaria para obtener un aumento en los τ_{PA} y τ_{PB} .
- c) Que sea la interacción de TEA externo con su propio sitio de unión en el vestibulo del canal, la condición necesaria para obtener un aumento en los τ_{PA} y τ_{PB} .

Actualmente no podemos distinguir entre las alternativas b y c, ya que si TEA se une al sitio de K^+ o al vestibulo externo del canal, en ambos casos se podría afectar la entrada de Ba^{+2} por un mecanismo de repulsión electrostática (aumento en los τ_{PA}) y también en ambos casos se interrumpiría la salida de Ba^{+2} por el lado externo (aumento en los τ_{PB}). Lo que si es posible afirmar, es que si este catión orgánico TEA, se une al vestibulo del canal, entonces la oclusión tipo tapón de un catión es una condición necesaria para obtener el aumento en los τ_{PA} y τ_{PB} , pero no sabemos si es suficiente. Por lo tanto, el uso de TEA como sonda favorece la alternativa a y la condición de suficiencia, espera ser dilucidada en el futuro.

Tenemos evidencia que TEA se esta uniendo a su propio sitio ya que la K_d para el TEA (figura 8), esta dentro del intervalo descrito en la literatura para la unión del

bloqueador (0.2 mM, 0.29 mM y 0.33 mM *trans* en Vergara y cols, 1984; Yellen, 1984; y Villarroel, 1986 respectivamente). La alternativa de que TEA se una a un sitio adentro del poro también es posible, ya que Taglialatela y cols. 1993 trabajando en otro canal de K⁺ (Kv2.1), observaron que al reemplazar ciertos aminoácidos adentro del poro, podían disminuir o estabilizar la afinidad del TEA por el sitio externo del canal. Nuestros resultados no demuestran, pero favorecen la idea de que un sitio externo adentro del poro que está accesible al TEA puede corresponder a uno de los sitios de unión de cationes monovalentes.

E. ¿ LOS SITIOS EXTREMOS EXTERNO E INTERNO SON LOS MISMOS DESCRITOS EN EL CANAL DE MÚSCULO ESQUELETICO ?

No tenemos la certeza de que los sitios de unión sean los mismos para todos los cationes, pero al menos podemos hacer estimaciones respecto a la afinidad de los sitios descritas por Neyton y Miller, 1988b. Como la ocupación del sitio externo induce un bloqueo de la salida de Ba⁺², al sitio externo se le ha denominado "External Lock-in site (ELI)". Según Neyton la k_i para K⁺ era de 20 μ M y la K_d para Rb⁺ era de 100 μ M. Nuestros resultados dan un K_d de 119 μ M y de 45 μ M para K⁺ y Rb⁺ respectivamente. Según estos resultados, si bien los valores no son coincidentes, el orden de magnitud indica que se trata del mismo sitio de alta afinidad. Esto queda en mayor evidencia si comparamos los K_d para Li⁺ de Neyton que fue de 30 mM y en este trabajo fue de 33 y 20 mM en ausencia y en

presencia de Ba^{+2} respectivamente. Eisenman y cols. 1986, mostraron que Rb^+ posee una mayor permeabilidad que conductancia respecto al K^+ , esto sugiere que Rb^+ se une más fuertemente al canal que el K^+ . Estas observaciones son coincidentes con nuestros resultados donde las constantes de asociación son mayores para el Rb^+ que para el K^+ en ausencia y en presencia de Ba^{+2} .

Por otro lado el sitio interno posee una constante de asociación para K^+ de 1.31 mM^{-1} semejante a la K_i descrita por Neyton (7 mM). Los sitios periféricos aludidos en músculo liso son semejantes y pueden ser considerados de la misma naturaleza a los descritos en músculo esquelético. El modelo cinético propuesto es válido con la suposición de que los sitios externo e interno son los mismos para todos los cationes utilizados y las evidencias que apoyan esta suposición son las distancias eléctricas y las afinidades relativas que son comparables a las descritas por Neyton y Miller, 1988b.

Hasta ahora, el ion Ba^{+2} ha demostrado ser una eficiente herramienta práctica para poner en evidencia las posiciones de los sitios, afinidades de éstos y la función de los aminoácidos involucrados en la selectividad o unión de bloqueadores. Recientemente, Tagliatela y cols. 1994 ha descrito al menos 2 sitios para unión de Ba^{+2} adentro del canal Kv2.1 (clonado de cerebro de rata). La unión de Ba^{+2} al sitio interno presenta cooperatividad, alejándose de una reacción de tipo bimolecular como en el K_{Ca} . El canal de cerebro de rata, el de túbulo transversal y el de membrana plasmática de origen sarcoplasmático de músculo liso han sido los primeros en ser explorados por esta nueva sonda: el ion bario.

CONCLUSION FINAL

Estudiando el efecto de distintos cationes monovalentes sobre los τ_{PA} y τ_{PB} del K_{Ca} , hemos caracterizado sobre la base de un modelo simple, los sitios de unión externo e interno y el efecto de la ocupación de estos sitios sobre las constantes cinéticas que caracterizan el bloqueo por Ba^{+2} .

La determinación de las constantes cinéticas supone que las constantes de rapidez de entrada o salida se refieren a los mismos sitios donde se unen los distintos cationes. Aunque no es posible asegurarlo, ésta es una de las restricciones de nuestro modelo. El ion Ba^{+2} nos ha permitido determinar de manera cualitativa, la ubicación relativa de los sitios de unión, demostrando inequívocamente la naturaleza multiionica de la vía de conducción.

El modelo presentado en este estudio es más completo que los modelos precedentes y es capaz de dar cuenta de nuevas propiedades y que ahora esperan por su corroboración a nivel molecular asignando la participación de determinados aminoácidos o grupos químicos que pueden definir uno o varios sitios en la vía de conducción. El modelo propuesto tiene además la ventaja de la flexibilidad, que permite calcular distintas constantes cinéticas o en equilibrio (o de pseudoequilibrio), tanto de los cationes permeantes como del bloqueador.

Al comparar los efectos producidos por los cationes monovalentes que permean el canal con aquellos que no lo hacen, podemos deducir que los cationes que no permean tienen una baja afinidad por los sitios más cercanos a la entrada del poro y por lo tanto

requiere de mayores concentraciones para bloquear el poro del canal. Es posible proponer que uno de los factores que permite a un ion permear el canal, es que el ion tenga sitios con afinidad por éste, a la entrada de la via de conducción.

REFERENCIAS

- Adelman, W. Jr. y French, R. 1978. Blocking of the squid axon potassium channel by external cesium ions. *J. Physiol.* 276:13-25
- Alvarez, O. 1986. How to set-up a bilayer system. In: *Ion Channel Reconstitution*. C. Miller, editor. Plenum Press Publishing Corp., New York. 115-130
- Alvarez, O., Villaroel, A. y Eisenman, G., 1992. Calculation of ion currents from energy profiles and energy profiles from ion currents in multibarrier, multisite, multioccupancy channel model. In *Methods in enzymology*. Edited by B. Rudy and L. Iverson. Academic Press, Inc. Vol.207: 816-854
- Armstrong, C., Swenson, R. P. Jr. y Taylor, R., 1982. Block of squid axon K⁺ channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen. Physiol.* 80:663-682
- Armstrong, C. y Taylor, S. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30: 473-488
- Blatz, A. L. y Magleby, K. L. 1986. Correcting single channel data for missed events. *Biophys. J.* 49: 967-980
- Butler, A., Tsunoda S., McCobb, D., Wei, A., Salkoff, L., 1993. *mSlo*, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 261:221-224
- Candia, S., Garcia., M. L., y Latorre, R. 1992. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *BioPhys. J.* 63:583-590
- Cecchi, X., Alvarez, O., 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
- Cecchi, X., Wolff, D., Alvarez, O. y Latorre R. 1987. Mechanisms of Cs⁺ blockade in a Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *Biophys. J.* 52:707-716
- Eaton, D. y Brodwick 1980. Effects of barium on the potassium conductance of squid axon. *J. Gen. Physiol.* 75:727-750
- Eisenman, G., Latorre, R., y Miller, C. 1986. Multi-ion conduction and selectivity in high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle. *Biophys. J.* 50:1025-1034

- Hagiwara, S., Miyasaki, S., Krasne, S. y Ciani, S. 1977. Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of 2 starfish in K^+ - Tl^+ mixtures. *J. Gen. Physiol.* 70: 269-281
- Hille, B. 1975. Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes. In *Membranes-1 Series of advances, Vol. 3: Lipid Bilayers and Biological Membranes. Dynamic Properties*, G. Eisenman (ed.). Marcel Dekker, New York. 255-323
- Hille, B. y Schwarz, W. 1978 Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J. Gen. Physiol.* 72:409-442
- Hodgkin, A. L. y Keynes, R. D. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol.* 128:61-88
- Latorre, R. y Miller, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium Channels. *J. Membrane Biol.* 71:11-30
- MacKinnon, R. y Yellen, G. 1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. *Science* 250:276-279
- Marty, A. 1981. Ca^{+2} -dependent K^+ channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497-500
- Miller, C. 1987. Trapping single ions inside single ion channels. *Biophys. J.* 52:123-126
- Miller, C., Latorre, R. y Reisin I. 1987. Coupling of voltage-dependent gating and Ba^{+2} block in the high-conductance, Ca^{+2} -activated K^+ Channel. *J. Gen. Physiol.* 90:427-449
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., Phillips, M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318.
- Moczydlowski, E. y Latorre, R. 1983. Gating kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions. *J. Gen. Physiol.* 82:511-542
- Neyton, J. y Miller, C. 1988a. Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92:549-567
- Neyton, J. y Miller, C. 1988b. Discrete Ba^{2+} block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Gen. Physiol.* 92: 569-586

Oberhauser, A. B. 1987. Caracterización del sitio de unión de calcio del canal de potasio activado por calcio del músculo esquelético de la rata. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias U. de Chile.

Shen, K. Z., Lagrutta, A., Davies, N. W., Standen, N.B., Adelman, J. P. y North, R. A., 1994. Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch.* **426**: 440-445

Sigworth, F.J. y Sine, S. M. 1987. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell Time histograms. *Biophys. J.* **52**:1047-1054

Sadoshima, J., Akaike, N., Tomoike, H., Kanaide, H. y Nakamura, M. 1988. Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortic media. *Am. J. Physiol.* **255**:H410-H418

Slaughter, R., Shevell, J. L., Felix, J. P., Garcia, M. L., y Kaczorowski, G. J. 1989. High levels of sodium-calcium exchange in vascular smooth muscle sarcolemmal membrane vesicles. *Biochemistry* **28**: 3995-4002

Standen N.B. y Stanfield P. R. 1978. A potential and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. *J. Physiol.* **280**: 169-191

Stockbridge, L. y French, A. 1988. Characterization of a calcium-activated potassium channel in human fibroblasts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**:1300-1307

Tagliatela, M., Drewe, . and Brown, H. A. 1994. Barium blockade of a clonal K⁺ channel and Its regulation by a critical pore residue. *Mol Pharmacol.* In Press.

Tagliatela, M., Drewe, J. A, Kirsh, G. E, De Biasi, M., Hartmann, H. A. and Brown, A.M. 1993. Regulation of K⁺/Rb⁺ selectivity and internal TEA blockade by mutations at a single site in K⁺ pores. *Pflugers Arch.* **423**:104-112

Vergara, C. y Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca²⁺ and Ba²⁺ blockade. *J. Gen. Physiol.* **82**:543-568

Vergara, C., Moczydlowski, E., y Latorre, R. 1984. Conduction, blockade and gating in a Ca²⁺-Activated K⁺ channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biophys. J.* **45**:73-76

Villaroel, A. 1986. Caracterización de las vías de acceso del canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético de rata. *Tesis de Magister en la Universidad de Chile.*

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

Yellen, G. 1984a. Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K^+ channels of bovine chromaffin cells. *J.Gen.Physiol.* 84:157-186

Yellen, G. 1984b. Relief of Na^+ block of Ca^{2+} -activated K^+ channels by external cations. *J. Gen. Physiol.* 84: 187-199

Yue, D. T. y Marban, E. 1990. Permeation in the dihydropyridine-sensitive calcium channel. Multi-ion occupancy but no anomalous mole-fraction effect between Ba^{2+} and Ca^{2+} . *J.Gen.Physiol.* 95:911-939

APENDICE

El modelo R3 predice una curva saturante para los cationes permeantes: Si hacemos por simplicidad a $\alpha[\text{Ba}^{2+}] = \alpha'$, **R3** predice que:

$$1/\tau_{\text{PA}} = \alpha_1' P_A + \alpha_2' P_{\text{AM}} \quad (\text{I}),$$

donde P_A es la probabilidad condicional de estar en un período de actividad. Ya que: $P_A = [A]/([A] + [AM])$ y $K_1 = [AM]/([A][M])$, entonces $P_A = 1/(1 + K_1[M_{\text{ext}}])$. Por otro lado $P_{\text{AM}} = [AM]/([A] + [AM])$ y por lo tanto $P_{\text{AM}} = K_1[M]/(K_1[M] + 1)$. El reemplazo en la ecuación I da:

$$\tau_{\text{PA}} = (1 + K_1[M])/(\alpha_1' + \alpha_2'K_1[M]) \quad (\text{II}),$$

De la misma manera R3 predice que:

$$1/\tau_{\text{PB}} = \beta_1 P_{\text{ABa}} + \beta_2 P_{\text{ABaM}} \quad (\text{III}),$$

Donde $P_{\text{ABa}} = [\text{ABa}]/([\text{ABa}] + [\text{ABaM}])$ y $K_2 = [\text{ABaM}]/([\text{ABa}][M])$, entonces $P_{\text{ABa}} = 1/(1 + K_2[M_{\text{ext}}])$. Por otro lado $P_{\text{ABaM}} = [\text{ABaM}]/([\text{ABa}] + [\text{ABaM}])$ y por lo tanto $P_{\text{ABaM}} = K_2[M]/(K_2[M] + 1)$. El reemplazo en la ecuación III da:

$$\tau_{\text{PB}} = (1 + K_2[M])/(\beta_1 + \beta_2K_2[M]) \quad (\text{IV}),$$

Estas predicciones (ecuaciones II y IV) indican la existencia de una relación saturante entre τ y $[M_{\text{ext}}]$.

En el caso de los cationes externos no permeantes, los datos se ajustan mejor con rectas que se derivan del mismo modelo, siempre que las constantes de rapidez de asociación y disociación de Ba^{2+} en presencia del catión externo sean cero y esto sucede a bajas concentraciones del catión no permeante. Por lo tanto, **R3** también predice que:

$$\tau_{PA} = 1/(P_A \alpha_1') \quad (V)$$

$$\tau_{PB} = 1/(P_{ABa} \beta_1) \quad (VI)$$

Donde PA y PABa son las probabilidades condicionales de estar en un periodo activo y bloqueado respectivamente. Las probabilidades son: $P_A = [A]/([A] + [AM])$; $P_{ABa} = [ABa]/([ABa] + [ABaM])$ y las constantes de asociación son $K_1 = [AM]/([A][M])$; $K_2 = [ABaM]/([ABa][M])$. La combinación de estas ecuaciones da como resultado las siguientes equivalencias:

$$\tau_{PA} = (1/\alpha_1') + (K_1/\alpha_1') [M] \quad (VII)$$

$$\tau_{PB} = (1/\beta_1) + (K_2/\beta_1) [M] \quad (VIII)$$

De las pendientes de estas rectas podemos calcular las constantes de asociación para el catión en ausencia (K_1) y en presencia del ion Ba^{+2} (K_2).