

UCH - FC
DOC - B
B 295
c. 1

**BASES MOLECULARES DE LA INACTIVACIÓN TIPO C
EN CANALES DE POTASIO *Shaker*.**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Claudia Cristina Basso Sotz

Santiago, Junio de 1998.

Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre de la Cruz.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

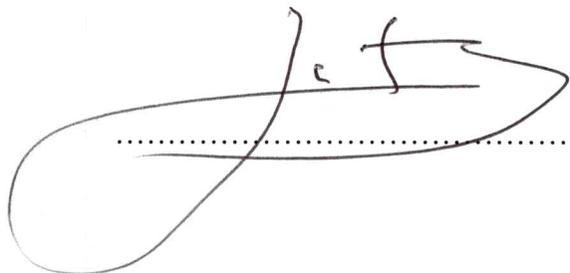
Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

CLAUDIA CRISTINA BASSO SOTZ

Ha sido aprobada por la Comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Junio de 1998

Director de Tesis

Dr. Ramón Latorre



Co-Director de Tesis

Dr. Pedro Labarca

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Osvaldo Alvarez

.....

Dra. Pilar Carvallo

.....

Dr. Ricardo Bull

.....

Dr. Nivaldo Inestrosa

.....

Dr. Eduardo Rojas



para Felipe,
todos los que quiero,
y mis cucas,
Enriqueta y Frida.

AGRADECIMIENTOS

Esta hoja es una pequeña demostración de gratitud y cariño hacia todas las personas que me apoyaron, ayudaron y soportaron durante mi tesis.

A Ramón, mi tutor, quien con infinita paciencia guío mis primeras aproximaciones a la electrofisiología. Ramoncito, gracias por estar siempre conmigo, como maestro y amigo.

A Osvaldo, que estuvo siempre dispuesto a tenderme la mano y darme un tiempito demostrando un gran interés por mi trabajo y formación.

A Felipe, quien me entregó su apoyo y amor en todo momento, compartiendo mis frustraciones y alegrías.

A Cecilia Rojas, que me mostró los secretos y misterios de la biología molecular, y en quien encontré una amiga.

A Pedro, mi cotutor, y a todos los profesores del laboratorio, Juan, Andrés, Daniel, y especialmente a Cecilia. También quiero dar las gracias a Eddie y Casilda, que estuvieron siempre dispuestos a ayudarme.

A Luisa, mi amiga, con quien compartí grandes momentos, y quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme en todo.

A mis compañeros de laboratorio y vida, Carlos, Gonzalo, Rodolfo, Magdalena, Oliver, Diego, Pato, Julio y Ricardo.

En el laboratorio viví años muy especiales para mí y siempre rodeada de amigos.....gracias a todos.

A Enrico Stefani quien me abrió las puertas de su laboratorio y donde descubrí que nunca terminare de aprender. A Ligia Toro quien me acogió en un rinconcito de su laboratorio. A Riccardo, Daniela y Francesca en quienes encontré nuevos y grandes amigos.

A todos los miembros de mi comisión, que demostraron gran interés por mi trabajo y me dedicaron su tiempo.

No puedo dejar de decirles a mis papas que los quiero mucho y agradezco todo el apoyo y amor que me dieron....también a mis hermanos Leonardo, Cati, Franco y a mis abuelos.

Al Centro de estudios Científicos de Santiago, CECS, en el cual me sentí como "en mi casa", y todas las personas que ahí trabajan....gracias.

También quisiera agradecer a la Fundación Andes que a través de su beca de Doctorado me distinguió y permitió llevar a cabo mis estudios de Postgrado. A FONDECYT que a través de un proyecto para tesis de Doctorado facilitó el buen desarrollo de mi trabajo.

INDICE DE MATERIAS

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>xi</i>
<i>LISTA DE TABLAS</i>	<i>xiv</i>
<i>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</i>	<i>xv</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>xvii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xx</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1. <i>Canales dependientes del potencial</i>	3
1.1. <i>Características generales de los canales iónicos dependientes del potencial</i>	3
1.2. <i>Clasificación de los canales de K⁺ de la super familia S4</i>	5
2. <i>Estructura de los canales de K⁺ dependientes del potencial</i>	6
2.1. <i>El poro de los canales de K⁺ y el filtro de selectividad</i>	6
2.2. <i>El sensor de potencial S4</i>	10
3. <i>Un tercer estado conformacional de los canales iónicos: el estado inactivado</i>	14
3.1. <i>Inactivación de tipo N</i>	15
3.2. <i>Inactivación de tipo C</i>	17
3.2.1. <i>Aminoácidos que participan en la inactivación tipo C</i>	18
3.2.2. <i>Existe un sitio de unión de K⁺ que modula la inactivación tipo C</i>	20
3.2.3. <i>Reordenamiento de la boca externa del poro</i>	23
3.2.4. <i>El estado inactivado tipo C puede alcanzarse desde el estado cerrado</i>	25
4. <i>Objetivos</i>	27
4.1. <i>Objetivo general</i>	27
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	27

<i>METODOS</i>	29
1. <i>Biología molecular</i>	29
1.1. <i>Bacterias</i>	29
1.1.1. <i>Cepas bacterianas</i>	29
1.1.2. <i>Cultivo de bacterias</i>	29
1.1.3. <i>Obtención de bacterias competentes</i>	30
1.1.4. <i>Transformación de bacterias</i>	30
1.2. <i>Antibióticos</i>	31
1.3. <i>Obtención y purificación de DNA plasmidial</i>	31
1.4. <i>Purificación de ácidos nucleicos en general</i>	31
1.5. <i>Clones</i>	32
1.6. <i>Subclonamiento de Shaker H4 Δ6-46 en pALTER</i>	33
1.7. <i>Transcripción in vitro</i>	35
1.7.1. <i>Linearización y purificación del DNA</i>	35
1.7.2. <i>Transcripción</i>	35
1.8. <i>M Mutagénesis puntual</i>	36
1.9. <i>Secuenciación del DNA</i>	38
1.10. <i>Construcción de dímero</i>	38
1.10.1. <i>Subclonamiento en el protómero A y en el protómero B</i>	40
1.10.2. <i>Obtención del dímero</i>	40
2. <i>Ranas, oocitos y microinyección</i>	42
2.1. <i>Ranas</i>	42
2.2. <i>Oocitos</i>	43
2.3. <i>Microinyección</i>	43
2.3.1. <i>Procedimiento de microinyección</i>	44
2.3.2. <i>Estandarización del nivel de expresión y coinyección</i>	45
3. <i>Registros electrofisiológicos</i>	46
3.1. <i>Pipeta de registro</i>	46

3.2. Soluciones de registro.	46
3.2.1. Corrientes macroscópicas.....	46
3.2.2. Corrientes de compuerta.	47
3.3. Sistema de registro	47
3.3.1. "Voltage-clamp" de dos microelectrodos	48
3.3.2. "Cut-open oocyte voltage clamp".....	49
3.4. Procedimiento de registro.....	49
3.4.1. Registro de corriente macroscópica:.....	51
3.4.2. Registro de corriente de compuerta.	51
4. Adquisición y análisis.	54
4.1. Corrientes macroscópicas.	54
4.1.1. Cinéticas de inactivación y recuperación de la inactivación.....	54
4.1.2. Coinyección de subunidades y mezcla al azar.....	55
4.1.3. Bloqueo por bario.	57
4.2. Corrientes de compuerta.	59
4.3. Modelos cinéticos.....	60
RESULTADOS	61
1. Características generales de la inactivación tipo C en canales de potasio	
<i>ShakerH4</i> $\Delta 6-46$	61
1.1. Cinética de inactivación.	61
1.2. Cinética de recuperación de la inactivación.	63
2. Participación de las subunidades α en el proceso de inactivación de tipo C.....	64
2.1. Coinyección de subunidades.	64
2.1.1. Mezcla de <i>ShakerH4</i> $\Delta 6-46$ T449S y <i>ShakerH4</i> $\Delta 6-46$ T449Y.....	65
2.1.2. Mezcla de <i>ShakerH4</i> $\Delta 6-46$ y <i>ShakerH4</i> $\Delta 6-46$ T449Y.	67
2.1.3. Ninguna de las subunidades determina por si sola la cinética de inactivación.	69

2.2. Dímero de subunidades.....	70
2.2.1. Dímero ShakerH4 Δ6-46 - ShakerH4 Δ6-46 T449Y.....	71
2.2.2. El orden de las subunidades no modifica el comportamiento del canal.	72
3. Interacción de aminoácidos en el proceso de inactivación de tipo C.	73
4. Accesibilidad del poro en el estado inactivado tipo C.	76
4.1. Existencia del estado inactivado tipo C bloqueado por Ba ²⁺	76
4.2. Velocidad de formación y disociación del complejo inactivado tipo C - Ba ²⁺	79
4.2.1. Cinética de disociación del complejo.	79
4.2.2. Cinética de formación del complejo Ba ²⁺ -inactivado tipo C.	80
4.2.3. La unión de Ba ²⁺ al canal inactivado tipo C es una reacción bimolecular.	84
4.3. Bloqueo del estado abierto por Ba ²⁺ extracelular.....	85
4.4. Dependencia del potencial y de la concentración de Ba ²⁺ del bloqueo del estado inactivado tipo C.	87
5. Efecto del Ba ²⁺ externo sobre la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta.	89
5.1. Efecto del Ba ²⁺ sobre el movimiento de cargas de compuerta en el canal ShakerH4 Δ6-46 W434F.	90
5.2. Efecto del Ba ²⁺ sobre el movimiento de cargas de compuerta en el canal ShakerH4 Δ6-46.....	94
5.3. El Ba ²⁺ se une al mismo sitio en el canal cerrado y en el canal en estado inactivado tipo C.....	98
6. Existen dos clases de inactivación de tipo C?.....	102
6.1. El canal ShakerH4 Δ6-46 I470C, un mutante de la inactivación tipo S6?	104
6.1.1. Un doble mutante que no se inactiva: ShakerH4 Δ6-46	

<i>T449V I470C</i>	106
<i>DISCUSIÓN</i>	109
1. <i>Reordenamiento de la boca externa del poro del canal</i>	111
1.1. <i>Todas las subunidades del canal participan en la inactivación de tipo C</i> . 114	
1.1.1. <i>mezclas de subunidades</i>	114
1.1.2. <i>Dímeros de subunidades</i>	119
1.1.3. <i>Todas las subunidades participan en forma cooperativa en la</i> <i>inactivación de tipo C</i>	122
1.2. <i>Interacciones de aminoácidos en el proceso de inactivación de tipo C</i> ... 123	
1.3. <i>Accesibilidad de la boca externa del poro del canal durante el estado</i> <i>inactivado tipo C</i>	127
1.3.1. <i>El Ba²⁺ puede unirse a un sitio en el canal inactivado</i>	129
1.3.2. <i>Modelo de unión de Ba²⁺ al estado inactivado tipo C</i>	131
2. <i>Interacciones entre dominios de la proteína durante la inactivación tipo C</i>	134
2.1. <i>El bario estabiliza el sensor de potencial en el estado inactivado</i>	137
2.2. <i>El sitio de Ba²⁺ en el canal inactivado podría ser el mismo sitio que en el</i> <i>canal cerrado</i>	140
3. <i>La inactivación tipo C es un sólo proceso molecular?</i>	142
3.1. <i>Mutantes que no se inactivan presentan un corrimiento en la curva</i> <i>Q(V)</i>	144
 <i>ANEXO 1</i>	 148
<i>Bloqueo por bario externo de los canales ShakerH4 Δ en estado cerrado</i>	148
 <i>ANEXO 2</i>	 151
1. <i>Modelo de inactivación concertado</i>	151
2. <i>Modelo de inactivación con subunidades independientes</i>	152

3. Dímero WT- T449Y.	152
ANEXO 3.....	154
BIBLIOGRAFÍA.....	157

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de una subunidad del canal de potasio ShakerH4.</i>	3
<i>Figura 2. Los canales de las subfamilias Shaker, Shal, Shab y Shaw muestran distintas propiedades cinéticas.</i>	6
<i>Figura 3. El poro del canal de potasio ShakerH4.</i>	7
<i>Figura 4. Corrientes de compuerta.</i>	11
<i>Figura 5. Esquema de la ubicación de las cargas del S4 en los estados cerrado y abierto.</i>	14
<i>Figura 6. Cinética de inactivación tipo C en mutantes puntuales del residuo en posición 449.</i>	19
<i>Figura 7. Esquema de la aproximación de las subunidades del canal y la unión del Cd²⁺ al estado inactivado.</i>	24
<i>Figura 8. Subclonamiento de ShakerH4 Δ6-46 en el vector pALTER.</i>	34
<i>Figura 9. Esquema del sistema de mutagenésis empleando el vector pALTER.</i>	39
<i>Figura 10. Esquema de la construcción de un dímero de subunidades α del canal ShakerH4 Δ6-46.</i>	41
<i>Figura 11. Gel de agarosa con el DNA y el mRNA de un dímero.</i>	42
<i>Figure 12. Esquema del sistema de registro "Cut-open oocyte voltage clamp".</i>	50
<i>Figura 13. Esquema de las proporciones esperadas para distintos canales formados por dos subunidades diferentes.</i>	56
<i>Figura 14. Cinética de inactivación de tipo C en el canal ShakerH4 Δ6-46.</i>	62
<i>Figura 15. Cinética de recuperación de la inactivación de tipo C del canal de potasio ShakerH4 Δ6-46.</i>	63
<i>Figura 16. Cinéticas de inactivación tipo C de canales obtenidos a partir de una mezcla de subunidades.</i>	66
<i>Figura 17. Las distintas subunidades se mezclan entre ellas.</i>	67
<i>Figura 18. Cinéticas de inactivación tipo C de la mezcla 2 WT: 1 T449Y.</i>	68

<i>Figura 19. El modelo de subunidades independientes no explica los resultados.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 20. Cinética de inactivación de los canales formados por el dímero WT-T449Y.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 21. Efecto de la mutación T449Y sobre la cinética de inactivación de la mutante D447E.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 22. Cinética de inactivación de los dobles mutantes en posición 447 y 449.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 23. El bario puede unirse al estado inactivado tipo C.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 24. El Ba²⁺ sale desde el mismo sitio, sin importar si entró al canal en estado inactivado tipo C o en estado cerrado.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 25. Velocidad de disociación del complejo inactivado tipo C-Ba²⁺</i>	<i>80</i>
<i>Figura 26. Velocidad de formación del complejo inactivado tipo C-Ba²⁺</i>	<i>82</i>
<i>Figura 27. Dependencia de la concentración de Ba²⁺ de 1/τ.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 28. Bloqueo por Ba²⁺ externo del estado cerrado del canal ShakerH4 Δ6-46</i>	<i>87</i>
<i>Figura 29. La asociación del Ba²⁺ al estado inactivado tipo C es independiente del potencial.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 30. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 W434F en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de -90 mV.</i>	<i>91</i>
<i>Figura 31. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 W434F en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de 0 mV.</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32. Curva de carga de compuerta normalizada en función del potencial en el canal ShakerH4 Δ W434F.</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de -90 mV.</i>	<i>95</i>

<i>Figure 34. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con un potencial de mantención de 0 mV.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 35. Curva de la carga de compuerta normalizada en función del potencial en el canal ShakerH4 Δ6-46.</i>	<i>97</i>
<i>Figura 36. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 D447N en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de -90 mV.</i>	<i>99</i>
<i>Figura 37. Registros de corrientes de compuerta de ShakerH4 Δ6-46 D447N en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de 0 mV.</i>	<i>100</i>
<i>Figura 38. Curva de carga normalizada de compuerta en función del potencial en el canal ShakerH4 Δ6-46 D447N.</i>	<i>101</i>
<i>Figura 39. Corriente máicroscópica del mutante I470C.</i>	<i>105</i>
<i>Figura 40. La curva Q(V) del mutante I470C se mueve a potenciales hipepolarizantes cuando el Hp = 0mV.</i>	<i>106</i>
<i>Figure 41. Corriente máicroscópica del doble mutante T449V I470C.</i>	<i>107</i>
<i>Figura 42. La curva Q(V) del doble mutante T449V I470C se mueve a potenciales hipepolarizantes cuando el Hp = 0mV.</i>	<i>107</i>
<i>Figura 43. Curvas Q(V) del canal silvestre y tres mutantes cuando el potencial de mantención es 0 mV.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 44. Posibles formas de ensamblaje de un dímero.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 45. Diagrama de energía de la unión del Ba²⁺ al estado inactivado.</i>	<i>131</i>
<i>Figura 46. Esquema que ilustra el cambio conformacional en el poro del canal ShakerH4 Δ6-46 cuando entra al estado inactivado tipo C.</i>	<i>134</i>
<i>Figura 47. Cinética de entrada y de salida de Ba²⁺ externo al canal en el estado cerrado.</i>	<i>148</i>
<i>Figura 48. La mutación D447N reduce la capacidad del Ba²⁺ de acelerar el retorno de las corrientes de compuerta.</i>	<i>150</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas $Q(V)$ de canales inactivados ($H_p = 0$ mV)	102
--	-----

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Å	Amstrong, 10^{-10} m
BSA	Seroalbumina de Bovino
CTX	Caribdotoxina
e	Carga elemental, 1.602×10^{-9} coulomb
Hp	Potencial de mantención
I	Intensidad de corriente
k	Constante de Boltzmann, 1.381×10^{-23} volts coulomb (Kelvin ⁻¹)
M	mol/litro de solución
mV	Milivolt, 10^{-3} volt
MTS	Metanotiosulfonato
pb	pares de bases
Q	Carga eléctrica
r	Radio
s	Segundo
T	Temperatura absoluta (medida en grados Kelvin)
TE	Tampón Tris-EDTA
TEA	Tetraetilamonio

V	Volt
z	Carga equivalente aparente
δ	fracción del campo eléctrico
μm	Micrómetro, 10^{-6} metro
μM	Micromolar, 10^{-6} molar
τ	Constante de tiempo
4-AP	4-aminopiridina

RESUMEN

Los canales de potasio dependientes del potencial eléctrico (K_v) juegan un papel fundamental en la respuesta eléctrica en las células excitables, es decir las células nerviosas y musculares. Algunos de ellos tienen la capacidad de inactivarse y pasar a un estado que no permite el flujo de iones K^+ sino hasta después del período de recuperación. La inactivación de los canales de potasio puede determinar la duración y frecuencia de los potenciales de acción determinando un período refractario sin capacidad de respuesta a un estímulo.

En los canales K_v existen dos tipos de inactivación, la de tipo N y la de tipo C, siendo esta última el tema central de esta tesis. A diferencia de la inactivación de tipo N, que es afectada por mutaciones en la región amino terminal, la inactivación de tipo C es afectada por mutaciones en el extremo carboxilo terminal. En particular, en la región del poro (región P) y en el último segmento transmembranal (S6). Estos y otros resultados llevaron a Yellen y col., en 1994, a postular que durante la inactivación de tipo C, el flujo de K^+ cesaría al ocurrir una constricción del vestíbulo externo del canal.

El principal objetivo de esta tesis fue investigar las bases moleculares de la inactivación de tipo C en canales de potasio tipo *Shaker*. Se intentó dilucidar distintos aspectos de la inactivación con el fin de entender el proceso y su modulación. Los estudios se realizaron empleando técnicas de electrofisiología, mediante las cuales se

midieron las corrientes iónicas y las corrientes de compuerta en varias mutantes en la región P y la región S6 del canal *ShakerH4* Δ 6-46.

Uno de los aspectos estudiados fue la participación de una o de todas las subunidades del canal en el proceso de inactivación de tipo C. En el caso de la inactivación de tipo N se sabe que el extremo amino terminal de una subunidad bloquea el flujo K^+ . De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, en el caso de la inactivación de tipo C el cambio conformacional que cierra el canal ocurriría en forma concertada. La participación de todas las subunidades en el proceso de inactivación coincide con el modelo de constricción, en el cual se propone el acercamiento de las cuatro subunidades en forma sincronizada.

Es posible obtener canales con cinéticas de inactivación muy distintas a la del canal silvestre mutando un solo aminoácido. Quisimos determinar si los efectos de las mutaciones de los residuos 447 y 449 de la región del poro son independientes o están acoplados. Los estudios cinéticos de canales con dobles mutaciones indican que existiría una interacción entre los aminoácidos de estas posiciones, la cual afectaría el proceso de inactivación.

Se estudió a que nivel ocurre la constricción del poro analizando la unión del Ba^{2+} al canal en estado inactivado tipo C. Demostramos que el bario es capaz de unirse a un sitio en el canal formando un complejo estable, y que la entrada del Ba^{2+} al canal es independiente del potencial. Los resultados obtenidos permiten plantear un modelo en el cual el cambio conformacional no ocurre en una pequeña región, sino que involucraría una zona extensa del poro.

Se ha correlacionado la inactivación tipo C con un cambio en la dependencia de potencial del movimiento de las cargas de compuerta ($Q(V)$), requiriéndose una mayor diferencia de potencial para movilizar la carga de compuerta de canales inactivados tipo C que de canales cerrados. Demostramos que el Ba^{2+} , que forma un complejo estable con el estado inactivado tipo C, estabiliza también el sensor de potencial en una nueva conformación. Fue posible establecer que la mutación puntual D447N, que afecta la unión del Ba^{2+} con el canal en el estado cerrado, elimina también el efecto del Ba^{2+} sobre la curva $Q(V)$.

Finalmente se intentó discriminar entre dos tipos de inactivación, los cuales han sido propuestos para diferenciar el efecto de las mutaciones en la región del poro (inactivación de tipo P) y en la región del segmento transmembranal S6 (inactivación de tipo S6). No fue posible distinguir las experimentalmente, aunque tampoco es posible descartar la existencia de ambas modalidades de inactivación. Se observó, en un mutante sin inactivación el corrimiento de la curva $Q(V)$ en respuesta a despolarizaciones prolongadas. Esto indica que, en este mutante se ha desacoplado el proceso que lleva a una nueva conformación del sensor de potencial del cambio conformacional en la boca del poro que impide el flujo iónico.

En conclusión podemos decir que los resultados de esta tesis apoyan la idea que propone que hay una constricción de la boca externa del poro del canal. Esta ocurriría durante el proceso de inactivación de tipo C. Además los resultados indican que el cambio conformacional no sólo involucra una región puntual en el poro, sino un cambio de mayor envergadura que modificaría la interacción del canal con los iones, así como la interacción entre los dominios funcionales de la proteína.

ABSTRACT

The biophysical properties of the voltage dependent potassium channels (K_v) determine the electrical responses of the excitable cells, that is neuronal and muscular cells. One of this properties is the ability to inactivate and arrive to state that does not allow the K^+ flux but only after a recovery period. The K^+ channel inactivation determine the duration and the frequency of the action potential, defining a refractory period, without response to stimulus.

Two types of inactivation are present in K_v channels, the N and the C type. The C type inactivation is the main subject of this thesis. While the N inactivation is affected by mutations on the amino terminal region, the C inactivation is affected by mutations on the carboxy terminal region, in particular, in the pore region (P region) and in the S6 transmembranal segment. These and other results took Yellen and collaborators, in 1994, to propose that during the C type inactivation, the K^+ flux stops because the external vestibule of the pore becomes constricted.

The principal objective of this thesis was to investigate the molecular bases of the *Shaker* potassium channel C-type inactivation. We attempted to clarify different aspects of the inactivation in order to understand this process and its modulation. These studies were made with electrophysiological techniques measuring the ionic currents and the gating currents in different P region and S6 region mutants of the *ShakerH4* $\Delta 6-46$ channel.

One of the features studied was the participation of one or all of the channel subunits on the C-type inactivation. In the N-type inactivation it is amino terminal end of one subunit which blocks the ionic flux. According to our results, in the C-type inactivation, the conformational change of the four subunits occurs in a concerted manner. The participation of all the channel subunits in the inactivation, is consistent with the constriction model, which supposes an approximation all of the subunits.

It is possible to obtain channels with inactivation kinetics that differ from the wild type channel by a single amino acid mutation. We attempted to determine whether the effects of a single mutation on residues 447 and 449 in the pore region were independent or coupled. The kinetics of double mutant channels suggests that these residues interact during the inactivation and this interaction would modify the process.

It was studied at which level of the pore the constriction occurs measuring the Ba^{2+} binding to the C-type inactivated channel. We demonstrated that Ba^{2+} is able to bind to a site in the channel forming a very stable complex, and that its entrance is voltage independent. In view of our results we postulate that the conformational change does not occur in a restricted area, but it involves a large zone of the pore.

A correlation was established between the C-type inactivation and a change in the voltage dependence of the gating charge movement ($Q(V)$). Inactivated channels require a large change of electrical potential than closed ones in order to move the gating charge. We demonstrated that Ba^{2+} , forming a very stable complex with C type inactivated channels, would stabilize also the voltage sensor in the new conformation.

We could establish that the point mutation D447N affecting the Ba^{2+} binding in the closed state, also eliminates the Ba^{2+} effect on the Q(V) curve.

We attempted to discriminate between the two types of inactivation that were proposed to differentiate the effects of the pore mutations (P type inactivation) from the S6 mutations (S6-type inactivation). We could not distinguish between them experimentally, but we could not discard this possibility. We observed, in the non inactivating mutant a shift in the Q(V) curve in response to prolonged depolarizations. In this mutant the process changing the voltage sensor conformation is uncoupled to the change in the pore that eliminates the ionic flux.

Our results support the existence of a constriction in the pore that should occur during the C-type inactivation. Furthermore they indicate that the conformational change does not only involve a local rearrangement, but a larger change that would modify the channel interaction with ions and interactions between functional domains of the protein as well.

INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son las proteínas especializadas en la regulación del flujo iónico a través de las membranas biológicas (Hille, 1992). Los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} juegan un papel fundamental en numerosos procesos celulares siendo la regulación de su paso hacia y desde la célula esencial para la vida. Estos cationes permitan la expresión de la excitabilidad de las células de los sistemas nervioso, muscular y neuroendocrino.

La selectividad de un canal es una característica íntimamente relacionada con su función y su estructura. La apertura o cierre de un canal selectivo permite a la célula modificar la permeabilidad de su membrana en forma específica, por ejemplo a un sólo ion. Existen canales altamente selectivos, capaces de discriminar entre iones que presentan la misma carga, como por ejemplo los canales de potasio que son 100 veces más permeables al K^+ que al Na^+ (Hille, 1992). Por otra parte existen canales muy poco selectivos que permiten el paso de distintos cationes, como por ejemplo el receptor de acetilcolina, que conduce con eficiencias muy parecidas los iones NH_4^+ , K^+ , Na^+ y Cs^+ .

Los canales iónicos presentan al menos dos estados conformacionales: el estado cerrado y el estado abierto. Los canales en el estado cerrado no permiten el paso de iones a través de ellos, a diferencia de los canales en el estado abierto que permiten el flujo de los iones en el sentido determinado por la gradiente electroquímica. Otra de

las características fundamentales de los canales iónicos, además de la selectividad, es la modulación de la transición entre estos dos estados. Existen básicamente dos tipos de moduladores de la activación o proceso de apertura de los canales iónicos: el potencial de membrana o la unión de ligandos. Sin embargo cabe señalar que se ha descrito un caso de regulación mixta, en el cual hay regulación por ambos factores: el canal de K^+ activado por calcio (Latorre y col., 1989). En los canales regulados por voltaje, existe en la proteína un sensor del potencial de membrana (Temple y col., 1987), lo que le confiere al canal la capacidad de sentir cambios en el potencial y modificar su conformación de modo que en ciertos intervalos de potencial se abre y en otros se cierra.

Algunos canales, además de los estados cerrado y abierto, pueden estar en un estado no conductor llamado inactivado, (cuando los canales entran al estado inactivado no pueden ser activados, llevados al estado abierto, y sólo cuando se han recuperado de la inactivación pueden abrirse nuevamente) (Hille, 1992). De este modo la inactivación de los canales representa otra forma de regulación de la permeabilidad a los iones de la membrana.

Existen al menos dos tipos de inactivación, llamados de tipo N y tipo C, siendo el tema central de esta tesis la inactivación de tipo C y sus bases moleculares. Se describirán en la primera parte de esta introducción en forma general la estructura de los canales de potasio dependientes de potencial, y su relación con la activación del canal, para luego describir en detalle los antecedentes existentes sobre el proceso de inactivación de tipo C.

1. Canales dependientes del potencial.

Los distintos tipos de canales de potasio son proteínas altamente conservadas entre los eucariontes (Latorre y Labarca, 1996). Los canales de K^+ han sido clasificados en super familias, de acuerdo a sus características estructurales, siendo una de ellas la “super familia de canales S4” o dependientes del potencial, a la cual pertenece el canal de potasio *Shaker* usado en esta tesis para estudiar la inactivación de tipo C.

1.1. Características generales de los canales iónicos dependientes del potencial.

Un canal de potasio perteneciente a la super familia S4 está formado por cuatro subunidades (MacKinnon, 1991), y cada una de ellas se caracterizan por tener seis segmentos hidrofobos que suponen ser transmembranales (Fig. 1).

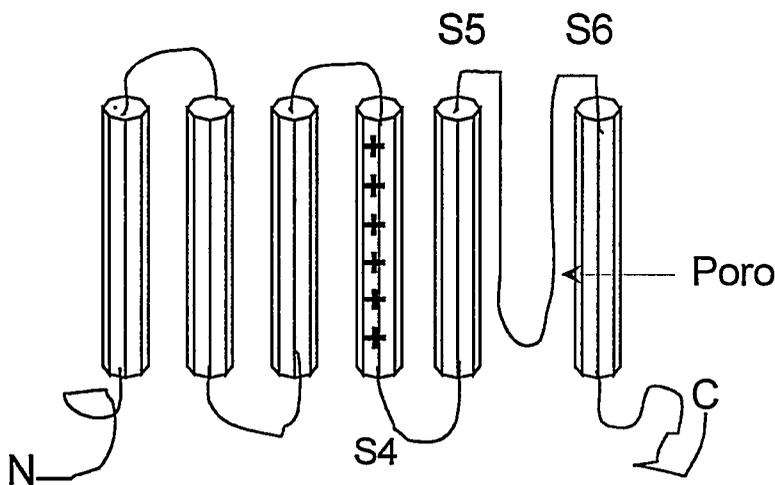


Figura 1. Esquema de una subunidad del canal de potasio *ShakerH4*. Se indican los extremos amino (N) y carboxilo (C) de la proteína, así como el segmento de transmembrana S4, que sería el sensor de potencial, y los segmentos S5 y S6, entre los cuales se ubica la región que formaría el poro del canal.

El segmento S4 presenta varios aminoácidos cargados positivamente, cada uno seguido de dos residuos no-polares o hidrofóbicos. Este segmento está altamente conservado en los canales de Ca^{2+} y de Na^+ de la misma super familia, y corresponde al cuarto segmento de transmembrana en cada dominio de estos canales, que están formados por una sola cadena polipeptídica con cuatro dominios de seis segmentos transmembranales (Noda y cols., 1984). Tomando en cuenta la secuencia y los estudios de mutagénesis, se ha postulado que el segmento S4 sería la región que detecta los cambios en el potencial de membrana constituyendo el detector de potencial de estos canales, al cual llamaremos sensor de potencial (Bezanilla y Stefani, 1994).

Otra región altamente conservada entre los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) es la región ubicada entre los segmentos S5 y S6, llamada región P. Esta zona de la proteína con forma de un asa que formaría las paredes del poro del canal (Hurst y col., 1991). En esta región se encuentra el filtro de selectividad del canal que determina el paso preferencial de iones potasio, en particular se ha descrito una secuencia de 8 aminoácidos denominada "signature sequence" que es determinante para este proceso (Heginbotham y col., 1994). La estructura de las regiones antes mencionadas y la relación con su función en el canal serán analizadas en detalle más adelante.

El cierre de los canales de potasio está mediado por una región de la proteína que actúa como puerta o "gate" acoplada al sensor de potencial, permitiendo un cierre o apertura del canal controlado por el voltaje. Se ha postulado que esta puerta estaría ubicada en el vestíbulo interno del poro del canal (Armstrong y Taylor, 1980).

1.2. Clasificación de los canales de K^+ de la super familia S4.

Los canales de potasio están distribuidos en forma ubicua en células y tejidos; su diversidad es determinante en la variedad de respuestas eléctricas frente a un estímulo (Hille, 1992) y los mecanismos a través de los cuales se genera esta diversidad son : el empalme (splicing) alternativo, la multiplicidad de genes y la formación de canales heteromultiméricos, es decir compuesto por subunidades no idénticas (Tempel y col, 1987, Schwarz y col., 1988, Isacoff y col., 1990). Se encontraron cuatro genes para los canales de potasio dependientes del potencial que dieron lugar a cuatro subfamilias de canales que en *Drosophila melanogaster* han sido llamadas *Shaker*, *Shab*, *Shaw*, y *Shal*, en tanto que sus homólogos mamíferos son Kv1, Kv2, Kv3 y Kv4, respectivamente (Jegla y Salkoff, 1994). *Shaker* y *Shal* son canales con corrientes transitorias de tipo A^1 , y se distinguen tanto en la cinética como en la dependencia del potencial, en tanto que *Shab* y *Shaw* son rectificadores tardíos² que difieren en las propiedades biofísicas (cinética de activación y dependencia del voltaje) (Fig. 2). Dentro de cada familia se agrupan varios canales generados por “splicing” alternativo, los cuales a su vez presentan variaciones en sus propiedades biofísicas, generando una diversidad que se ve aumentada por la mezcla de subunidad heterólogas lo que genera canales con nuevas propiedades (Isacoff y col., 1990).

¹ Las corrientes de potasio de tipo A son corrientes transitorias, es decir una corriente de salida que se inactiva rápidamente (Hille, 1992)

² Los rectificadores tardíos son canales de potasio que modifican la conductancia de la membrana con retardo respecto al cambio de potencial.

Resulta interesante el hecho que los canales heteromultiméricos sólo puedan formarse entre miembros de una misma subfamilia (Yu y col., 1996).

El canal de potasio usado en esta tesis para el estudio de la inactivación tipo C, es el canal de potasio *Shaker*H4 o *Shaker* B1, de *Drosophila melanogaster* (Schwarz y col., 1988).

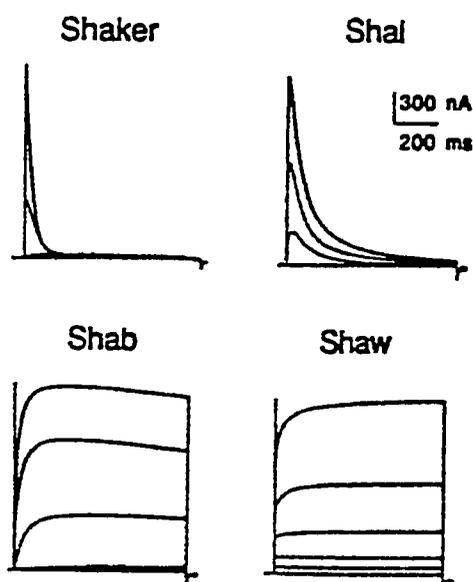


Figura 2. Los canales de las subfamilias *Shaker*, *Shal*, *Shab* y *Shaw* muestran distintas propiedades cinéticas.

Se muestran las corrientes de salida en respuesta a pulsos desde -80 a 20 mV, cada 20 mV, con un potencial de mantención de -90 mV. (figura tomada de Jegla y Salkoff, 1994)

2. Estructura de los canales de K^+ dependientes del potencial

2.1. El poro de los canales de K^+ y el filtro de selectividad.

Sin lugar a dudas la caracterización de la región que constituye el poro del canal fue un paso fundamental en la comprensión del funcionamiento de éstos. El

bloqueo de los canales por toxinas y la determinación de los residuos que participan en su unión fue la primera aproximación al estudio del poro del canal (MacKinnon y Miller., 1989, Hurst y col., 1991). Los aminoácidos implicados en la unión de toxinas están localizados en una región entre los segmentos S5 y S6 que fue denominada región P. Esta región de 19 aminoácidos (Fig. 3) es una zona hidrofóbica y se postula que formaría una horquilla o asa, delimitada por prolinas, la cual formaría el poro del canal (Kirsch y col., 1992).

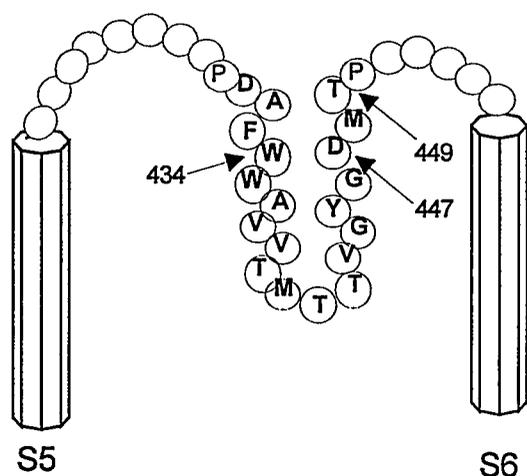


Figura 3. El poro del canal de potasio *ShakerH4*.

Se muestran los segmentos de transmembrana 5 y 6, y entre ellos la región que forma el poro del canal (P). Se destacan el número de los residuos que son importantes para procesos que se describen en esta tesis.

El uso de subunidades quiméricas, formados a partir de canales con conductancias unitarias diferentes, fue una prueba determinante de que esta región constituye el poro del canal. El sólo traspaso de la región P determina la conductancia unitaria del canal: cuando el poro era Kv2.1 y el resto del canal Kv3.1, el canal presentaba la conductancia unitaria de un canal Kv2.1, y vice versa (Hartman y col., 1991).

Otra región que ha sido implicada en la formación del poro del canal es el asa S4-S5, que estaría implicada en la selectividad (Slesinger y col., 1993). Mutaciones puntuales en este asa, afectan la selectividad del canal y también la afinidad por el bloqueador tetraetilamonio (TEA) aplicado internamente. La región inmediatamente posterior al segmento transmembranal S6 también formaría parte de la vía de conducción del canal (la boca interna del poro) puesto que mutaciones puntuales en esta región del canal Kv2.1 modifican la afinidad por la 4-aminopiridina (4-AP) y el TEA aplicados internamente (Shieh y Kirsch, 1994).

Una de las características importantes de los canales K_v es su gran selectividad para el ion K^+ , capacidad que está íntimamente ligada a la vía de conducción y a su secuencia. Los canales de K^+ tienen una secuencia de 8 aminoácidos dentro de la región P que es altamente conservada entre ellos, cuatro de estos residuos, GYGD, son indispensables para la selectividad del canal (Heginbotham y col., 1994, Kirsch y col., 1995). Los estudios de mutagénesis puntual de esta región han indicado que ella forma el filtro de selectividad del canal, y que las mutaciones en esta región transforman un canal de potasio en un canal no selectivo o un canal no conductor.

La región P tiene 19 aminoácidos y no es un segmento transmembranal sino que un asa (MacKinnon, 1995). El extremo amino de la región P parecería estar en forma paralela a la membrana y sólo una pequeña parte entraría realmente en la membrana (Hidalgo y MacKinnon., 1995). Los estudios recientes de la arquitectura del poro del canal de K^+ han revelado que la región P forma una vía de conducción que tendría la forma de un cono poco profundo, el residuo tirosina 445, que forma

parte del filtro de selectividad, estaría en el centro y se localizaría a 0,5 nm de la superficie del canal (Ranganathan y col., 1996).

Todas las conclusiones mencionadas anteriormente respecto al poro del canal han sido basadas en experimentos de mutagénesis y electrofisiología, y sólo este año se reportó una estructura obtenida mediante cristalografía de rayos-X (Doyle y col., 1998). Se obtuvieron cristales de una proteína integral de membrana de *Streptomyces lividans* que tiene una estructura (estudiada mediante la unión de una toxina de escorpión) y una secuencia altamente conservada al ser comparada con otros canales de K^+ . Este canal tiene sólo dos segmentos transmembranales, equivalentes a S5 y S6 de *Shaker*, entre los cuales se ubica la región P. El poro del canal tiene una forma de cono invertida, y el filtro de selectividad mide 12 Å de largo. El filtro es capaz de coordinar dos K^+ separados por una distancia de 7.5 Å. La interacción entre el filtro de selectividad y los K^+ ocurre a través de los grupos carbonilos de los enlaces peptídicos, estando las cadenas laterales orientadas hacia la proteína y no hacia el poro. Las cadenas laterales de la valina y tirosina del filtro GYGD estabilizan las posiciones de los grupos carbonilos mediante interacciones electrostáticas con los triptofanos (434 y 435 en *Shaker*) de la región P. Se determina de esta manera un poro de un diámetro preciso, capaz de coordinar un K^+ deshidratado, pero incapaz de coordinar iones de radio menor como Na^+ y Li^+ . El vestíbulo interno del poro aloja un tercer K^+ , que se encuentra hidratado.

2.2. El sensor de potencial S4.

En la descripción clásica de las corrientes iónicas, Hodgkin y Huxley (1952) propusieron un modelo con partículas cargadas que frente un cambio en el campo eléctrico se reordenan en la membrana. Cuando todas las partículas pasan a un estado permisivo se produciría un cambio en el canal que permitiría la conducción de los iones. Cuando el canal de Na^+ de *Electrophorus electricus* fue clonado se encontró que el cuarto segmento transmembranal de cada dominio tenía entre 4 y 8 argininas separadas por dos aminoácidos hidrófobos o no polares (Noda y col., 1984). En el canal de potasio *Shaker*, se describió también una región con 7 aminoácidos cargados positivamente ubicados cada tres residuos en el segmento S4 (Temple y col., 1987). Se propuso que esta región podría ser el sensor de potencial eléctrico de los canales iónicos y que se movería en respuesta a una modificación del potencial. Este movimiento induciría un cambio conformacional en la proteína, que llevaría a la apertura del poro (Noda y col., 1984). El movimiento de estas cargas en respuesta a cambios en el potencial eléctrico generaría una corriente diferenciable de la producida por el movimiento de los iones a través del canal, llamada corriente de compuerta, la cual había sido medida experimentalmente una década antes del clonamiento de los canales (Armstrong y Bezanilla, 1973, Keynes y Rojas, 1974). La mutagénesis puntual proporcionó las evidencias directas de que esta región es parte del sensor de potencial determinándose que mutaciones en las posiciones de los aminoácidos cargados

modificaban la dependencia del potencial del proceso de apertura (Papazian y col., 1991, Liman y col., 1991).

Las corrientes de compuerta que se generan durante la apertura del canal (*activación*) como durante el cierre (*desactivación*) han sido estudiadas en detalle. En el proceso de activación las cargas de compuerta pasan desde una posición no permisiva (canal cerrado) a una posición permisiva (canal abierto) generando una corriente de compuerta positiva, en tanto que en el proceso de desactivación las cargas vuelven desde la posición permisiva (canal abierto) a la no permisiva (canal cerrado) observándose una corriente de compuerta negativa (Fig. 4). Una de las características

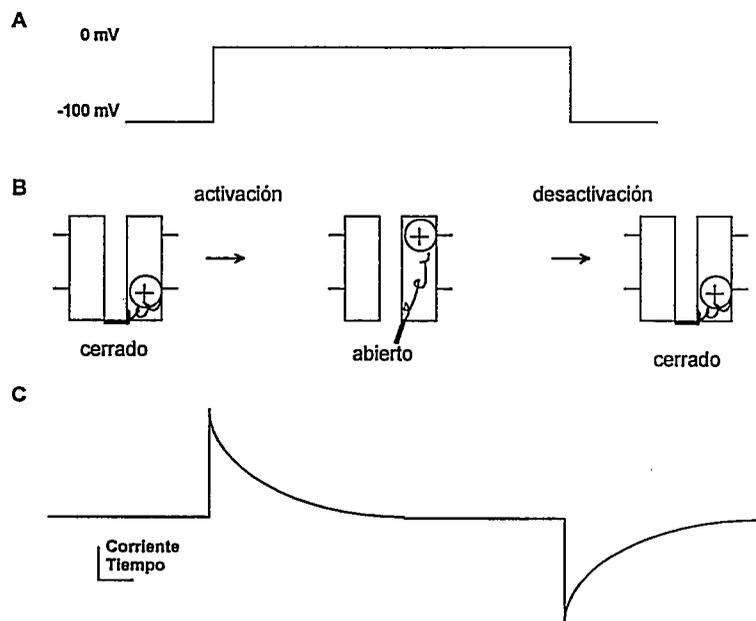


Figura 4. Corrientes de compuerta.

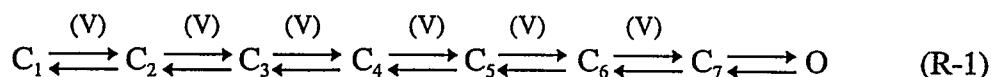
(A). Pulso de voltaje despolarizante. (B). En respuesta a la despolarización el canal pasa desde el estado cerrado al estado abierto, cambiando de posición las cargas de compuerta. Cuando se termina el pulso el canal retorna al estado cerrado, volviendo la carga de compuerta a su posición original. La compuerta se ubica hacia el lado intracelular (C). Cuando la carga de compuerta se mueve para abrir el canal, se

observa una corriente de compuerta positiva, en tanto que cuando la carga retorna a su posición original al finalizar el pulso se observa una corriente negativa.

importantes del canal *Shaker* es que la curva $Q(V)$ [cargas de compuerta (Q) en función del potencial eléctrico (V)] se ubica a la izquierda de la curva $G(V)$

[conductancia (G) en función del potencial eléctrico (V)] en el eje del potencial (Stefani y col., 1994). Además, la corriente de compuerta precede en el tiempo a la corriente iónica. Estas observaciones indican que el movimiento de las cargas de compuerta es un evento que ocurre entre estados cerrados (que por simplicidad han sido dibujados como uno sólo en la figura 4B) y antes del paso al estado abierto.

Por otra parte, la apertura del canal que se refleja en la aparición de corriente iónica, ocurre con retardo respecto al inicio del pulso despolarizante. La duración de este período de retardo depende del potencial de mantención que se emplee: mientras más positivo es el potencial de mantención menor es el retardo, a pesar que el pulso de prueba se da siempre a un mismo potencial. Una explicación para este retardo es la existencia de una serie de transiciones entre varios estados cerrados. A medida que el potencial de mantención es más positivo, la población de canales que se encuentran en alguno de los estados cerrados más cercano al estado abierto aumenta (ver esquema R-1). Por esta razón tardan menos tiempo en abrirse en respuesta a un pulso de potencial despolarizante. Un modelo cinético para la activación del canal *Shaker* con 7 estados cerrados (C) y un estado abierto (O) (ver esquema R-1), permite describir la corriente de compuerta. En este modelo la carga se mueve principalmente entre los estados cerrados, siendo éstas las transiciones dependientes del potencial eléctrico (V) (Bezanilla y col., 1994).



Como era de esperar, las mutaciones en el segmento S4 afectan las corrientes de compuerta si este fuese el sensor de potencial (Perozo y col., 1994). Se debe señalar que ciertas mutaciones no permiten la translocación de la proteína canal a la membrana celular. Las mutaciones que afectan la maduración de la proteína pueden ser contrarrestadas introduciendo mutaciones en residuos cargados negativamente en los segmentos S2 y S3 (Papazian y col., 1995). Estos resultados han permitido proponer que interacciones entre los residuos con carga positiva en el segmento S4 y los residuos con carga negativa en los segmentos S2 y S3 estabilizarían el estado cerrado y otras interacciones estabilizarían el estado abierto.

Este cambio de interacciones electrostáticas durante la activación del canal implica un cambio de posición del sensor, lo que ha sido comprobado experimentalmente. En efecto, la accesibilidad de las argininas del segmento S4 del canal de Na^+ , determinado a través de la reacción química de la cisteína (con que fueron reemplazadas las argininas) con un metanotiosulfonato (MTS), se modifica durante la activación (Yang y Horn, 1995). En los canales de potasio se comprobó de la misma manera que los residuos del segmento S4 sufrían un cambio de accesibilidad durante la activación del canal (Larsson y col., 1996). En este caso se reemplazaron uno por uno los aminoácidos positivos por cisteínas y se observó su capacidad de reaccionar con MTS. El cambio en la posición de los residuos se muestra en la figura 5. Resulta extraño que sean una o cuatro las cargas inaccesibles al MTS, puesto que para que una región de una proteína atraviese el ancho de la membrana se requiere de 20 aminoácidos, lo que implica que todas las cargas del segmento S4 deberían estar en

la membrana y ser inaccesibles. La explicación sería que el sensor de potencial está en un canal acuoso y solamente unos pocos residuos se encuentran rodeados por otras partes de la proteína (Yang y col., 1997).

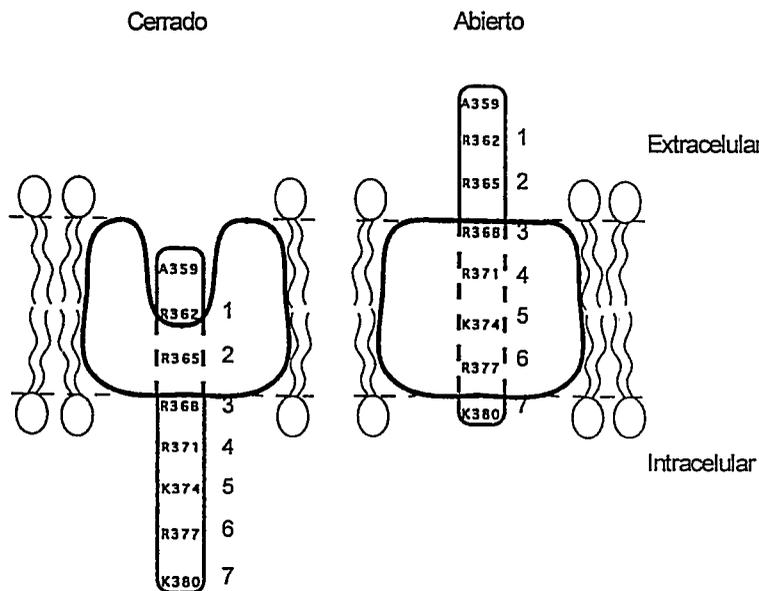


Figura 5. Esquema de la ubicación de las cargas del S4 en los estados cerrado y abierto.

Se muestran los aminoácidos cargados del segmento transmembranal S4, numeradas de la 1 a la 7. En el estado cerrado solamente el aminoácido cargado 2 está inaccesible, en tanto que en el estado abierto son inaccesibles los aminoácidos cargados 3, 4, 5 y 6 (figura modificada de Larsson y col., 1996).

3. *Un tercer estado conformacional de los canales iónicos: el estado inactivado.*

Además de los estados cerrados y abierto de los canales iónicos, se ha descrito un tercer estado conformacional llamado estado inactivado. Cuando un potencial despolarizante es mantenido en el tiempo el canal pasa al estado inactivado, estado en el cual el canal no conduce. El canal es capaz de salir de este estado sólo si la membrana es repolarizada. La rapidez de inactivación y de recuperación determinan la frecuencia de disparos de potenciales de acción de una neurona actuando como marcapaso de su actividad eléctrica, y determinando períodos refractarios en los cuales no hay capacidad de respuesta de las células (Hille, 1992).

Como se ha indicado anteriormente los canales de K^+ dependientes del potencial presentan dos tipos de inactivación, la inactivación de tipo N o inactivación rápida y la inactivación de tipo C o inactivación lenta. A continuación se describen las principales características de la inactivación de tipo N antes de describir los antecedentes existentes sobre el mecanismo de inactivación de tipo C.

3.1. Inactivación de tipo N.

Al despolarizar la membrana plásmática de una célula que exprese el canal *Shaker B*, también llamado *ShakerH4*, los canales se abren y rápidamente entran en el estado inactivado. Esta inactivación ocurre con una constante de tiempo, τ , entre 2 y 4 ms (Murrel-Lagnado y Aldrich, 1993). Mediante supresiones de distintas partes de la proteína Hoshi y col. (1990) determinaron que el dominio N terminal de 83 aminoácidos es el responsable de la inactivación.

Con anterioridad se describió en los canales de Na^+ un proceso de inactivación, proponiéndose que ella ocurriría cuando una parte del canal, que puede ser removida mediante un tratamiento con pronasa aplicada intracelularmente, obstruye el lado citoplasmático del poro (Armstrong y col., 1973). La cinética de remoción de la inactivación con una proteasa específica, proteinasa alcalina b, indicó que probablemente se estaba liberando un pequeño péptido de la proteína (Rojas y Rudy, 1976). Bezanilla y Armstrong (1977) postularon el modelo de "bola y cadena" en el cual una región de la proteína es la bola, la cual interactuaría con otra región del canal

llamada el receptor de la bola obstruyendo el flujo iónico. La región que ocluye la vía de conducción del canal de Na^+ es el segmento que une a las pseudosubunidades III y IV, que actúa como una especie de bisagra. En el caso de los canales de K^+ se propuso un mecanismo de bola y cadena para la inactivación de tipo N, donde los 22 primeros residuos son la bola y los 61 que siguen, la cadena. Dentro de la secuencia de la bola hay una región hidrófoba, la cual interactúa con el receptor y estabiliza la unión (mutaciones en esta región afectan la constante de disociación), y una región con cargas positivas que permite interacciones electrostáticas de largo alcance (mutaciones aquí afectan la constante de asociación) (Hoshi y col., 1991, Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993, Toro y col., 1994).

Se demostró que la cinética de inactivación cambia en forma proporcional al número de bolas que presenta el canal (MacKinnon y col., 1993, Gomez-Laguna y Armstrong, 1995). Esto llevó a proponer que el extremo amino terminal o la bola de cada subunidad actúa en forma independiente de las otras bolas, bastando la unión de una de ellas a su receptor para que el canal se inactive (un canal formado por cuatro subunidades de *ShakerH4* tiene 4 bolas).

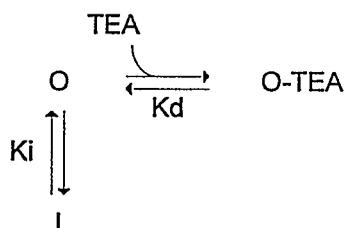
Los iones externos son capaces de modular la inactivación de tipo N: a medida que aumenta la concentración de K^+ externo la recuperación de la inactivación se hace más rápida. Además del efecto de los iones permeantes, se ha descrito un efecto similar para el Cs^+ , que es un bloqueador del canal, cuya unión es capaz de acelerar la recuperación de la inactivación (Gomez-Lagunas y Armstrong, 1994). De

este modo, cambios en las concentraciones de los iones en el medio extracelular podrían modificar el comportamiento eléctrico de una célula.

3.2. Inactivación de tipo C.

Al suprimir los aminoácidos 6-46 la inactivación de tipo N desaparece, sin embargo es posible observar un segundo tipo de inactivación en los canales de K^+ *ShakerH4* $\Delta 6-46$, la cual se ha denominado inactivación de tipo C o inactivación lenta, ya que ocurre con un τ entre 2 y 4 s (Hoshi y col., 1991). La inactivación lenta es un proceso independiente del potencial eléctrico.

El primer informe de este tipo de inactivación fue proporcionado por Grissmer y Cahalan (1989), en un canal de K^+ de linfocito, en el que el TEA aplicado externamente disminuía la rapidez de inactivación aunque la integral de la corriente en el tiempo era constante. La integral de la corriente en el tiempo, es decir, la carga total que se movió a través del canal es una constante para un modelo en el que el canal sólo puede pasar al estado inactivado cuando no está bloqueado. Esto se resume en el siguiente esquema cinético



donde O es el estado abierto, I el estado inactivado y O-TEA el estado abierto-bloqueado. El mismo efecto fue descrito para el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$, en que la

inactivación se enlentece solamente cuando el TEA es aplicado externamente y no internamente (Choi y col., 1991).

3.2.1. *Aminoácidos que participan en la inactivación tipo C.*

Los canales *ShakerH4* (o *ShakerB*) y *ShakerA* presentan distinta rapidez de inactivación tipo C. La diferencia entre ellos son tres aminoácidos, dos ubicados en el segmento S6 y uno en la región carboxilo terminal, sin embargo sólo este último modifica la inactivación (Hoshi y col., 1991). Supresiones de regiones del carboxilo terminal no remueven la inactivación de tipo C, a diferencia de lo que ocurre en la inactivación de tipo N, donde la supresión de regiones del extremo amino terminal la modifican. Estos resultados indicaron que en el caso de la inactivación de tipo C, el mecanismo no sería de bola y cadena.

Por otra parte los antecedentes del enlentecimiento de la inactivación por TEA externo y el conocimiento de que el residuo 449, ubicado en la boca externa del poro, participa en la unión del bloqueador (MacKinnon y Yellen, 1990, Heginbotham y MacKinnon, 1992), llevaron a estudiar el efecto de mutaciones puntuales en este residuo sobre la inactivación tipo C. Se obtuvieron canales con cinética de inactivación exponencial con constantes de tiempo desde los 80 ms hasta 10 s, según el aminoácido que ocupara la posición 449 (Labarca y MacKinnon, 1992, López-Barneo y col., 1993) (Fig. 6).

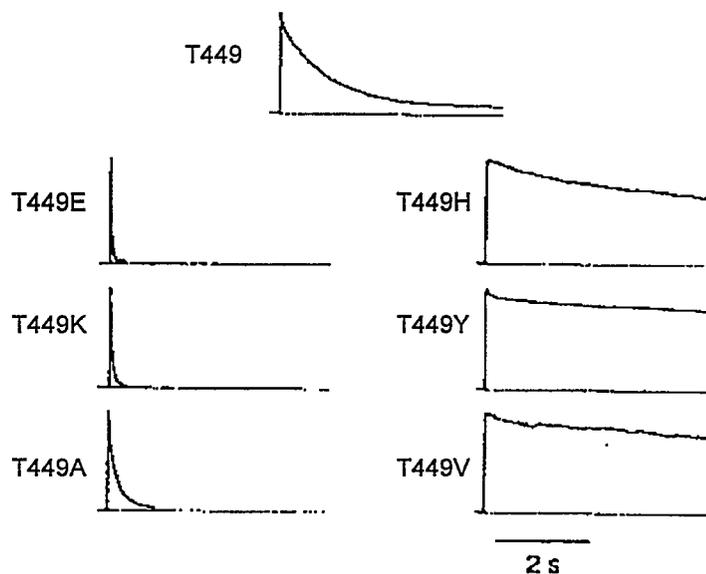


Figura 6. Cinética de inactivación tipo C en mutantes puntuales del residuo en posición 449.

Se muestra el canal silvestre donde el residuo en el canal silvestre es treonina (T). existe un grupo de mutantes puntuales que presentan cinéticas de inactivación más rápidas que el silvestre (mutantes E, K y A) y otro de cinética más lenta (mutantes H, Y y V). (figura tomada de López-Barneo y col., 1993)

La inactivación de tipo C se relacionó primero con un residuo ubicado en el extremo C-terminal de la proteína, y más tarde con el poro del canal, en particular el residuo 449. De Biasi y col. (1993) llamaron la atención sobre una posible confusión de fenómenos, al describir una mutación puntual en el poro de un canal quimérico en el cual el TEA aplicado externamente (en bajas concentraciones) aumentaba la velocidad de inactivación y la corriente máxima. Ellos llamaron a este proceso inactivación de tipo P, para diferenciarlo de la inactivación lenta que es afectada por mutaciones en la región carboxilo terminal. Aún no ha sido posible dilucidar si es un solo proceso o son dos los procesos de inactivación.

Hay que destacar que los estudios de los residuos que influyen la inactivación de tipo C, fueron enfocados al efecto de las mutaciones puntuales. No se conoce si existen interacciones entre amino ácidos durante el proceso de inactivación de tipo C que lo modulen.

3.2.2. *Existe un sitio de unión de K^+ que modula la inactivación tipo C.*

La modulación por K^+ externo fue descrita en cultivos de neuronas del hipocampo, en que la inactivación se hacía más lenta a medida que se aumentaba la concentración de este ion (Pardo y col., 1992). En el caso de las distintas mutantes de la posición 449 se observó el mismo efecto aunque en distintos grados según el aminoácido que reemplazó la treonina del canal silvestre (López-Barneo y col., 1993).

Cuando se estudiaron otros iones se descubrió que existe una correlación entre la capacidad de modificar la inactivación y la capacidad de cruzar la membrana a través del canal, proponiéndose la existencia de un sitio de unión para iones cuya ocupación impide que el canal se inactive, mecanismo que es conocido como “pie en la puerta” o “foot in the door”. Este mecanismo fue propuesto por Swenson y Armstrong (1981) para explicar el enlentecimiento del cierre del canal a medida que se aumentaba la concentración de K^+ o Rb^+ externo. Un aumento de la concentración de potasio externo modifica tanto la cinética de entrada al estado inactivado (la hace más lenta) como la cinética de recuperación (la hace más rápida) (Levy y Deutsch, 1996a, Levy y Deutsch, 1996b).

Se ha observado acumulación de canales en estado inactivado cuando se repiten pulsos despolarizantes si el tiempo entre los pulsos no es suficiente para que los canales se recuperen de la inactivación. Se observó que este proceso es diferente cuando se estudian canales *ShakerH4* $\Delta 6-46$ o canales *ShakerH4* (con inactivación tipo N presente) (Baukrowitz y Yellen, 1995). Cuando los canales tienen inactivación de tipo N además de tipo C la acumulación de canales inactivados es mayor y es sensible al potasio externo, a medida que aumenta el potasio externo esta acumulación disminuye. La diferencia entre estos dos canales es que en uno hay flujo de K^+ a través del canal (*ShakerH4* $\Delta 6-46$) en tanto que en el otro, el flujo cesa por la inactivación (*ShakerH4*). Estos resultados se pueden explicar si se considera que la probabilidad de ocupación de un sitio que liga K^+ disminuye dando lugar a una inactivación tipo C más rápida.

Puesto que el residuo 449 (en *ShakerH4*) al cual se une el TEA también afecta en forma dramática el proceso de inactivación tipo C, se estudió el efecto de este bloqueador en la sensibilidad de los canales al potasio externo y se observó que cuanto más alta era la concentración de TEA externo más sensible era el canal a la concentración de potasio externo (Lopez-Barneo y col., 1993). El bloqueador entonces, se uniría al estado inactivado dejando atrapado el potasio dentro del canal, y desestabilizando el estado inactivado tipo C. Apoyando esta idea, se ha demostrado que cuando la histidina del canal Kv1.3, que ocupa la posición equivalente a 449 en *Shaker*, está protonada el canal es menos sensible al TEA, aún cuando la sensibilidad

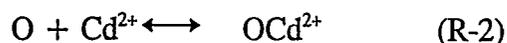
al potasio externo no se ve afectada (Levy y Deutsch, 1996b). Este resultado permitió proponer que el sitio al cual se une el potasio que modula la inactivación se ubicaría hacia el interior del poro, respecto del sitio de TEA (Heginbotham y MacKinnon, 1992), teniendo este bloqueador un efecto alostérico sobre este proceso. Además Molina y col. (1997) describieron un doble mutante de *ShakerH4* $\Delta 6-46$, D447E T449Y, donde el TEA no modifica la cinética de inactivación tipo C pero si la afecta el K^+ externo, apoyando así la idea que el residuo 449 no participaría directamente en la inactivación sino que regularía la unión del potasio a un sitio más profundo.

La constante de disociación aparente para el potasio externo, el cual afecta el proceso de inactivación, fue estimada en condiciones en que el flujo de K^+ a través del canal es prácticamente nulo, usando bloqueadores internos. El efecto de la concentración de K^+ externo sobre la cinética de inactivación de la corriente no bloqueada permite estimar un valor de 2 mM para la constante de disociación. Además, estudiando la dependencia del potencial de este proceso se propuso que este sitio estaría localizado en el centro del campo eléctrico en el canal Kv1.4 (Baukrowitz y Yellen, 1996).

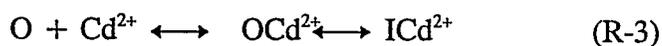
En resumen, se ha postulado la existencia de un sitio de unión de potasio, ubicado posiblemente en una posición más intracelular que el sitio de unión de TEA. La ocupación de este sitio modularía el proceso inactivación de tipo C, debiendo vaciarse para que el canal pueda inactivarse.

3.2.3. Reordenamiento de la boca externa del poro.

Hoshi y col. (1991), en sus primeros estudios de la inactivación tipo C, propusieron que éste era un proceso que involucraba una constricción de la boca externa del canal. Los primeros resultados experimentales que apoyaron esta idea fueron proporcionados por Yellen y col. (1994) mediante el uso de una mutación puntual en la posición 449 de *ShakerH4* Δ6-46, en la cual se reemplaza la treonina por una cisteína, aminoácido que puede coordinar el ión cadmio. En este mutante el cadmio puede unirse al estado abierto, y la curva de rapidez de unión en función de la concentración tiende a la saturación lo que permite descartar una reacción bimolecular como la que se muestra a continuación.



Si este fuese el caso se esperaría una relación lineal entre la concentración del Cd y la rapidez de unión. Además se determinó que el paso al estado inactivado se favorece con la unión de Cd^{2+} externo al estado abierto, aunque también puede unirse directamente a canales inactivados, observándose en ambos casos la misma cinética de recuperación del bloqueo. Este hecho llevó a postular que el proceso además de la unión al estado abierto (O), involucraría el paso al estado inactivado (I), siguiendo un esquema



Esto junto al hecho que la afinidad del cadmio por el canal en estado inactivado es 45000 veces mayor que la afinidad por el estado abierto, llevó a postular que la boca

del canal externa sufriría un reordenamiento cuando el canal pasa desde el estado abierto al estado inactivado, en el cual los aminoácidos de esta región se expondrían al medio o las subunidades se aproximarían unas a otras, facilitando la unión del cadmio al estado inactivado (Fig. 7).

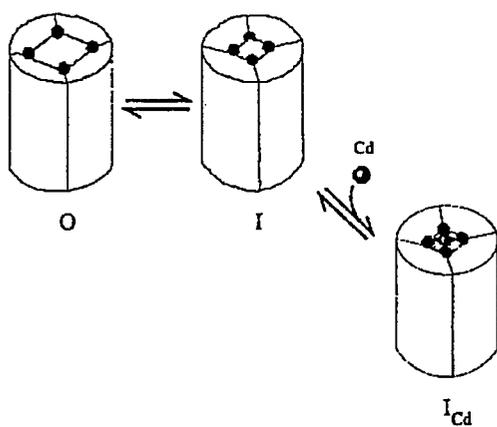


Figura 7. Esquema de la aproximación de las subunidades del canal y la unión del Cd^{2+} al estado inactivado.

Cuando el canal pasa desde el estado abierto (O) al estado inactivado (I) las subunidades se aproximan entre si permitiendo la unión del cadmio con mayor afinidad. (figura tomada de Yellen y col., 1994).

Otra evidencia de un reordenamiento en el poro fue proporcionada mediante la sustitución por cisteína de los residuos 447 al 451 de la boca externa del canal y el estudio de su accesibilidad con reactivos químicos derivados del metanotiosulfonato (MTS), capaces de reaccionar con la cisteína y bloquear la conducción del canal. Estos experimentos revelaron que durante el proceso de activación al menos tres residuos cambian su exposición al medio (Liu y col., 1996). Los residuos 448, 449 y 450 no son accesibles en el estado cerrado pero si lo son en el estado inactivado, incluso los residuos 448 se acercarían entre ellos, o quedarían con tal grado de libertad en el estado inactivado, que pueden formar puentes disulfuro. Los estudios de unión del compuesto químico llamado CP-339.818, que sólo se une al estado inactivado tipo C y

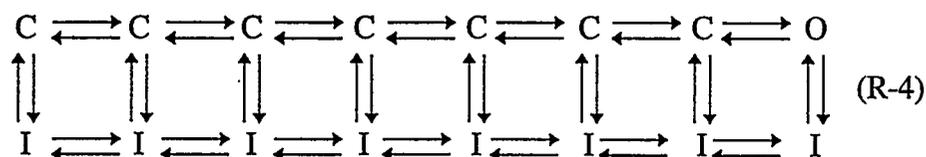
no al abierto ni al cerrado (Nguyen y col., 1996), apoyan la idea de un cambio en la accesibilidad o exposición de los residuos de la boca externa del canal.

Todos los antecedentes aquí presentados apoyan la idea de una constricción en la boca externa del poro, sin embargo no se ha determinado su extensión ni si ella impide la entrada de iones al poro del canal. Una suposición del modelo de constricción es que las subunidades se aproximan unas con otras, pero no está claro si realmente las cuatro participan en el proceso.

3.2.4. *El estado inactivado tipo C puede alcanzarse desde el estado cerrado.*

En el caso de la inactivación tipo N el canal debe abrirse para poder inactivarse, mientras que en la inactivación de tipo C los canales cerrados pueden también inactivarse. Cuando se comparan las corrientes máximas en respuesta a pulsos despolarizantes del canal *Shaker*H4 Δ 6-46 T449K en bajas concentraciones y altas concentraciones de K^+ se observa un aumento del máximo, lo que es contrario a lo esperado tomando en cuenta la gradiente electroquímica. Esto podría ser debido a que en una baja concentración de K^+ los canales cerrados se inactivan disminuyendo la fracción disponible para abrirse (López-Barneo y col., 1993). Marom y Levitan (1994) estudiando canales únicos que solo en un 50 % de los casos se observaban aperturas, y de estos, un 90 % no se abrían en el pulso siguiente, lo que indica que los canales estaban inactivados a pesar de que al potencial de reposo empleado no habrían canales abiertos.

Por otra parte, se observó un corrimiento en el eje del potencial de la curva de carga de compuerta en función del potencial ($Q(V)$) cuando el estado inicial de los canales es inactivado (potencial de mantención, $H_p = 0$ mV) respecto a cuando es cerrado ($H_p = -90$ mV) (Olcese y col., 1997). Si la carga de los canales que inicialmente estaban inactivados y van al estado cerrado se devolviera por la misma vía que la carga que se movió desde el estado cerrado al inactivado, esperaríamos que el movimiento de carga tuviese la misma dependencia del potencial, lo cual no ocurre. Para explicar este resultado se postuló una vía alternativa de movimiento de carga entre estados inactivados, los que se conectarían con los estados cerrados (R-4), ocurriendo movimiento de carga sólo a través de las líneas horizontales y no las verticales.



Con el fin de establecer que el corrimiento en el eje del potencial de la curva $Q(V)$ era producto de la inactivación tipo C, se compararon los cursos temporales del corrimiento de la curva $Q(V)$ y el establecimiento de la inactivación tipo C, comprobándose que era el mismo, así como el de la vuelta a la posición de canales cerrados en la curva $Q(V)$ y la recuperación de la inactivación (Olcese y col., 1997).

Además se observó, en ambos casos, un mismo curso temporal para las corrientes macroscópicas y la corrientes de compuerta.

4. *Objetivos.*

Los antecedentes antes mencionados apoyan la idea de una constricción a nivel de la boca externa del poro del canal *Shaker*. Sin embargo son pocos los resultados que indican cómo participan las subunidades en el proceso y como afecta este proceso el acceso de iones al vestíbulo externo del poro.

4.1. *Objetivo general.*

El **objetivo general** de esta tesis fue el estudio de las bases moleculares de la inactivación tipo C en el canal de potasio *Shaker*. Se intentó dilucidar durante esta tesis qué cambios sufre el canal cuando pasa desde el estado cerrado al estado inactivado, esto es cómo se reordena el poro del canal y cómo se modifica su relación con otras partes de la proteína y los iones.

4.2. *Objetivos específicos.*

Para desarrollar este objetivo general nos planteamos las siguientes preguntas:

- i. ¿Participan todas las subunidades del canal en el proceso de inactivación de tipo C?
Para esto se estudió el comportamiento de canales formados por dos tipos de subunidades.

- ii. ¿Existen interacciones entre aminoácidos de la boca externa del canal durante el reordenamiento de esta región? Se estudió el comportamiento cinético de canales con mutaciones en dos residuos del poro que se han descrito afectan la inactivación de tipo C.
- iii. ¿Es posible acceder al poro del canal en el estado inactivado? Se estudió la accesibilidad del poro del canal empleando como sonda el Ba^{2+} , que presenta un radio iónico similar al K^+ pero que es capaz de bloquear el flujo iónico.
- iv. ¿Es capaz el Ba^{2+} de estabilizar el sensor de potencial en el estado inactivado tipo C? Se analizó el cambio en la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta de los canales inactivados en ausencia y en presencia de Ba^{2+} , intentando descubrir si el Ba^{2+} estabiliza aún más la conformación que adquiere el sensor de potencial en el estado inactivado tipo C.
- v. ¿Es posible discriminar dos mecanismos de inactivación de tipo C? Algunos autores han planteado la posible existencia de dos mecanismos molecularmente distintos, los cuales habrían sido confundidos bajo el nombre de inactivación tipo C. Estudiando mutantes en la región del poro y en la región transmembranal S6 intentamos discriminar estos dos posibles tipos de inactivación.

METODOS

1. *Biología molecular.*

1.1. *Bacterias.*

1.1.1. *Cepas bacterianas.*

Las cepas bacterianas usadas se eligieron de acuerdo a sus características genéticas. La cepa DH5 α se usó para amplificar las secuencias clonadas en los vectores de la serie pBS (Promega Corp., Madison, WI USA) y pALTER (Promega Corp., Madison, WI USA). La cepa JM109 se usó para amplificar el vector pALTER (Promega Corp., Madison, WI USA) e infectar con el fago "helper" R801, dado que esta cepa, crecida en medio mínimo M9 (Sambrook y col. 1989), expresa una proteína de membrana que es usada por el fago como receptor. La cepa BMH 71-18mutS se utilizó en una fase del procedimiento de mutagénesis *in vitro*, "Altered Sites[®]" (Promega Corp., Madison, WI USA), ya que no repara el DNA de doble hebra que esta desapareado.

1.1.2. *Cultivo de bacterias.*

Los cultivos de bacterias se crecieron en un medio líquido a 37 °C el cual se agitó a 225 ciclos/minuto, en un agitador orbital. El medio utilizado en el crecimiento fue LB (Luria-Bertani) o Typ (Sambrook y col. 1989). Para los cultivos en medio

sólido, se usó el medio líquido suplementado con agar al 15% (Sambrook y col, 1989).

Todos los medios se esterilizaron a 125 °C y 15 psi.

1.1.3. *Obtención de bacterias competentes.*

Se creció un cultivo en medio líquido hasta una densidad óptica (DO) de 0,2, para luego sedimentar las bacterias y resuspenderlas en una solución estéril y fría de CaCl₂ 50 mM, manteniéndolas en hielo por 30 min, con el fin de obtener células competentes. Las bacterias competentes se resuspendieron en 4 ml de una solución estéril de CaCl₂ 50 mM y glicerol 15%, almacenándose a -80 °C aquellas que no se usaron inmediatamente.

1.1.4. *Transformación de bacterias.*

Se agregó 0,75 µl de DMSO a una alícuota de 50 µl de bacterias competentes manteniéndola en hielo durante 10 min. Se añadió entonces 1 ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min. antes de someter a las bacterias a un choque térmico de 42 °C durante 60 s. Luego de transferirlas al hielo por 2 minutos, las bacterias se crecieron durante 45 min en 4 ml de medio líquido sin antibiótico, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada en el plasmidio. El cultivo se transfirió a placas con medio sólido suplementadas con antibiótico, y se incubaron a 37 °C, durante 12 a 16 horas.

1.2. *Antibióticos.*

La selección de las bacterias se realizó de acuerdo a la resistencia a antibióticos codificada en el plasmidio. El antibiótico se añadió al medio estéril, una vez frío, a partir de soluciones concentradas mantenidas a -20 °C. La ampicilina se usó a una concentración de 100 µg/ml, a partir de un stock 100 mg/ml en agua; la tetraciclina se usó a una concentración de 10 µg/ml, a partir de una solución madre de 10 mg/ml en etanol (Sambrook y col. 1989).

1.3. *Obtención y purificación de DNA plasmidial.*

El DNA se extrajo a partir de un cultivo de bacterias crecido durante toda la noche a 37 °C, con agitación. El DNA plasmidial se purificó en columnas para preparación de DNA "mini" "Qiagen" según las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA).

1.4. *Purificación de ácidos nucleicos en general.*

La purificación de DNA sometido a digestión enzimática u otro tratamiento, u ocasionalmente del RNA transcrito *in vitro*, se efectuó mediante una extracción en fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y dos extracciones en cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), seguidas por una precipitación con 0,15 volúmenes de acetato de sodio (2 M, pH 4) y 2,5 volúmenes de etanol. Luego de centrifugar los ácidos nucleicos en una microcentrífuga por 15 min a 160000 g, el precipitado se lavó

dos veces con etanol 70%. La integridad del ácido nucleico se verificó según el patrón de migración, en geles de agarosa (0,7% a 0,9%), teñidos con bromuro de etidio 0,66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (a partir de una solución de 10 mg/ml). El peso molecular se estimó por comparación con estándares de peso molecular y concentración conocidos. En estos geles también se realizó una estimación preliminar de la concentración de las muestras. El DNA y el RNA se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón Tris-EDTA (TE) pH 8 (Sambrook y col, 1989) o agua libre de RNAsas, respectivamente, para obtener las concentraciones finales deseadas. La concentración final de cada ácido nucleico fue calculada por absorbancia a 260 nm.

1.5. Clones.

El cDNA codificante de la subunidad α del canal de potasio *Shaker* H4 o *Shaker* B, clonado de *Drosophila melanogaster* (Schwarz y col, 1988) con la supresión de los aminoácidos 6 al 46 (*Shaker* H4 Δ 6-46) descrita por Hoshi y col. en 1990, fue gentilmente proporcionado por el Dr. Roderick MacKinnon, de Rockefeller University, USA. La región que se transcribe es de 2900 pb en tanto que la secuencia que se traduce es de 1800 pb. El cDNA está clonado en el vector de doble hebra pBS (Stratagene, La Jolla, CA, USA) entre los sitios de restricción SacII y EcoRI. Este cDNA fue subclonado en el vector de mutagénesis pALTER (Promega Corp., Madison, WI USA). El tamaño del cDNA clonado en Bluescript incluido el vector (pBShaker) es de 5171 pb y en pALTER (pAShaker) es 7987 pb.

1.6. Subclonamiento de *Shaker H4 Δ6-46* en *pALTER*.

El fragmento que contiene el cDNA de *Shaker H4 Δ6-46* (de 2312 pb) fue obtenido del vector *pBShaker* mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI*. Estas enzimas tienen un sitio único de restricción en el vector *pBS*. Luego de la doble digestión se recuperó el segmento de 2312 pb a partir de un gel de agarosa al 0,7 % (Fig. 8A). Los fragmentos de interés se recuperaron de geles preparativos de agarosa de 0,7% escindiendo las bandas de peso molecular adecuado, y se purificaron usando el "kit" de extracción de DNA desde geles "QIAEX" (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA 91311, USA). También se digirió el vector *pALTER* que presenta sitio de restricción únicos para *SacII* y *KpnI* en la región de múltiples sitios de clonamiento ("polylinker"). El fragmento *SacII/ KpnI* de 5675 pb se purificó a partir de un gel de agarosa al 0,7 % (Fig. 8A). Con el fin de evitar la recircularización, este fragmento fue desfosforilado en su extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de bovino (Promega Corp., Madison, WI USA). Para separar el DNA de la enzima se efectuó una extracción en una solución de fenol-cloroformo seguida de una en cloroformo-alcohol isoamílico, para finalmente precipitarla con acetato de sodio (ver sección 1.4) y resuspenderlo en tampón TE. Posteriormente, los fragmentos se ligaron con 2 unidades de la enzima DNA ligasa T4 (Promega Corp., Madison, WI USA) para generar el vector *pAShaker*, de 7987 pb (Fig 8B). La presencia del fragmento fue verificada mediante los siguientes criterios: i)

según el patrón de migración del DNA en geles de agarosa, **ii)** por la recuperación del fragmento SacI/KpnI a partir de la digestión del vector pAShaker con las mismas enzimas.

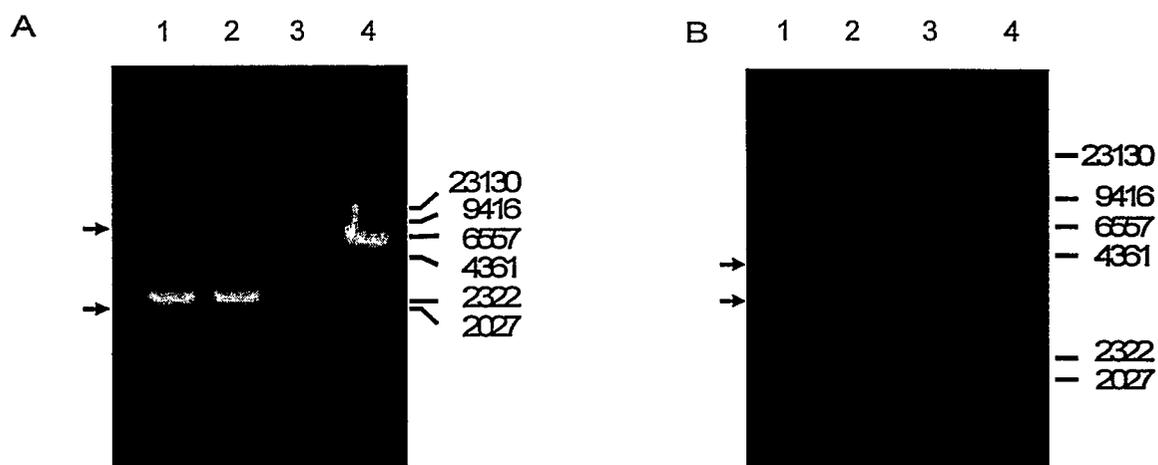


Figura 8. Subclonamiento de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ en el vector pALTER.

(A). Las flechas indican la posición de los segmentos SacI/KpnI que contiene la secuencia que codifica para *ShakerH4* $\Delta 6-46$ (carril 1 y 2) y del segmento SacI/KpnI del vector pALTER (carril 4). El marcador de peso molecular λ HindIII se muestra en el carril 3 (en pares de bases). (B). Las flechas indican la posición del DNA circular y sobreenrollado del vector pALTER (carril 1) y de pAShaker (carril 2 y 3). El marcador de peso molecular λ HindIII se muestra en el carril 4(en pares de bases).

1.7. *Transcripción in vitro:*

1.7.1. *Linearización y purificación del DNA:*

Los plasmidios se linearizaron con una enzima de restricción de corte único cuyo sitio se encuentra en el extremo 3' de la región a transcribir. En el caso de los DNA clonados en el vector Bluescript se utilizó Hind III y en tanto que para los DNA clonados en pALTER se empleó Kpn I. Se linearizaron 2 µg de DNA según el protocolo recomendado para cada enzima, en un volumen total de 10 µl. La mezcla de reacción se incubó por 1 hora a 37 °C. La linearización se verificó cargando 0,4 µl de la reacción en un gel de agarosa al 0,7% y estimando el tamaño del DNA. El DNA lineal se purificó como se describió anteriormente en el punto 1.3.

El DNA se resuspendió en 4 µl de tampón TE de modo de obtener una concentración final de 0,5 µg/µl. Todas las soluciones empleadas en la purificación del DNA así como el material plástico eran libres de RNAasas.

1.7.2. *Transcripción:*

La transcripción in vitro se efectuó con el kit mMMESSAGE mMACHINE (Ambion Inc., Austin, TX USA). Se usó la enzima RNA polimerasa T7, puesto que el DNA codificante se encuentra bajo el control del promotor T7, en ambos vectores (pALTER y pBS). Los reactivos se agregaron en el siguiente orden: 1 µl de agua libre de RNAasa, 1 µl del tampón de transcripción (10X), 5 µl de NTP-Cap mix (ATP

15 mM, CTP 15 mM, UTP 15 mM, GTP 3 mM y Cap 12 mM), 2 μ g de DNA y 1 μ l de enzima (10X).

Esta mezcla se incubó 1 hora a 37 °C . Luego para terminar la reacción el DNA se digirió agregando 2 unidades de DNAasa Q1 e incubando por 15 minutos a 37 °C. Para precipitar el RNA se agregaron 15 μ l de agua y 12,5 μ l de cloruro de litio (LiCl 7.5 M, EDTA 75 mM) y se mantuvo a -20 °C por una hora. Finalmente se efectuó un lavado con etanol 70% y se resuspendió el RNA en agua libre de RNAasa. La integridad del transcrito obtenido se verificó en un gel de agarosa al 0,7% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, donde 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 40 μ g/ml.

1.8. *Mutagénesis puntual:*

Para efectuar las mutaciones puntuales se empleó el procedimiento de mutagénesis in vitro "Altered Sites" (Promega Corp., Madison, WI USA), que usa el vector p ALTER. El DNA que codifica para la subunidad del canal Shaker H4 Δ 4-46, que se encontraba originalmente en el vector pBS, fue subclonado en el vector de mutagénesis pALTER. Este método se explicará en forma general.

El vector pALTER tiene los genes que confieren la resistencia a la tetraciclina y la ampicilina. Sin embargo, el gen de resistencia a ampicilina tiene una mutación puntual, por lo cual las bacterias transformadas con este vector son resistentes sólo a tetraciclina. El vector pALTER es un fagémido, lo que quiere decir que en presencia

de un fago "helper", puede formar partículas virales cuyo material genético es DNA de hebra simple (Fig. 9). El fago helper aporta los genes que codifican las proteínas de la capsula viral, y las proteínas que activan el ciclo viral induciendo el encapsulamiento en forma de virus de DNA de hebra simple. De este modo, al infectar bacterias que portan el vector pALTER con el inserto del DNA de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ con el fago helper R801 es posible purificar del medio de cultivo, partículas virales del fagémido pALTER. De este modo se puede obtener DNA de hebra simple, con el cual se alinea el oligonucleótido mutagénico. En este oligonucleótido se introducen el o los cambios de nucleótidos respecto a la secuencia silvestre, de modo de cambiar un aminoácido por otro. Se emplearon oligonucleótidos entre 24 y 27 pb de longitud dependiendo del número de ácidos nucleicos que se debían mutar. Al mismo tiempo se alinea un segundo oligonucleótido mutagénico que restaura la resistencia a ampicilina. Luego de extender la segunda hebra a partir de estos oligonucleótidos, el plasmidio se amplifica en bacterias *E. coli* BMH71-18 mutS, bacterias que no tienen el sistema de reparación del DNA, y posteriormente en DH5 α donde se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina. De este modo se aumentan las probabilidades de tener la mutante de nuestro interés. Con este método fueron obtenidas todas las mutaciones puntuales, y también las mutaciones dobles (partiendo con una mutante simple como DNA templado).

1.9. *Secuenciación del DNA.*

La secuencia de nucleótidos del DNA se determinó usando el "kit" de secuenciación Sequenase Ver. 2.0 (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL 60005, USA) basado en el método de "terminación de la cadena por dideoxinucleótidos" (Sambrook y col. 1989). Los DNA de distinto largo, marcados con dATP- $\alpha^{35}\text{S}$ (NEN, Boston, MA 02118, USA) fueron separados en geles de poliacrilamida al 6%: 9 ml de poliacrilamida 40% (19 % acrilamida, 1 % bisacrilamida), 27,6 gr de urea, 6 ml de tampón TBE (10X), en un total de 60 ml. La reacción de gelificación fue catalizada con 90 μl de persulfato de amonio 25 % y 90 μl de TEMED. El gel se precorrió por 30 min a 55 Watts y la electroforesis se corrió a 60 Watts por 4 horas y 40 min. Los geles fueron lavados y deshidratados con una solución de ácido acético 5% y metanol 15%, y posteriormente secados. La detección de las bandas de DNA se hizo por autoradiografía.

1.10. *Construcción de dímero:*

Los dímeros de subunidades α del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ se generaron a partir de dos vectores pBS modificados para este fin, y gentilmente proporcionados por el Dr. Roderick MacKinnon, de Rockefeller University, USA. Los cDNA de las

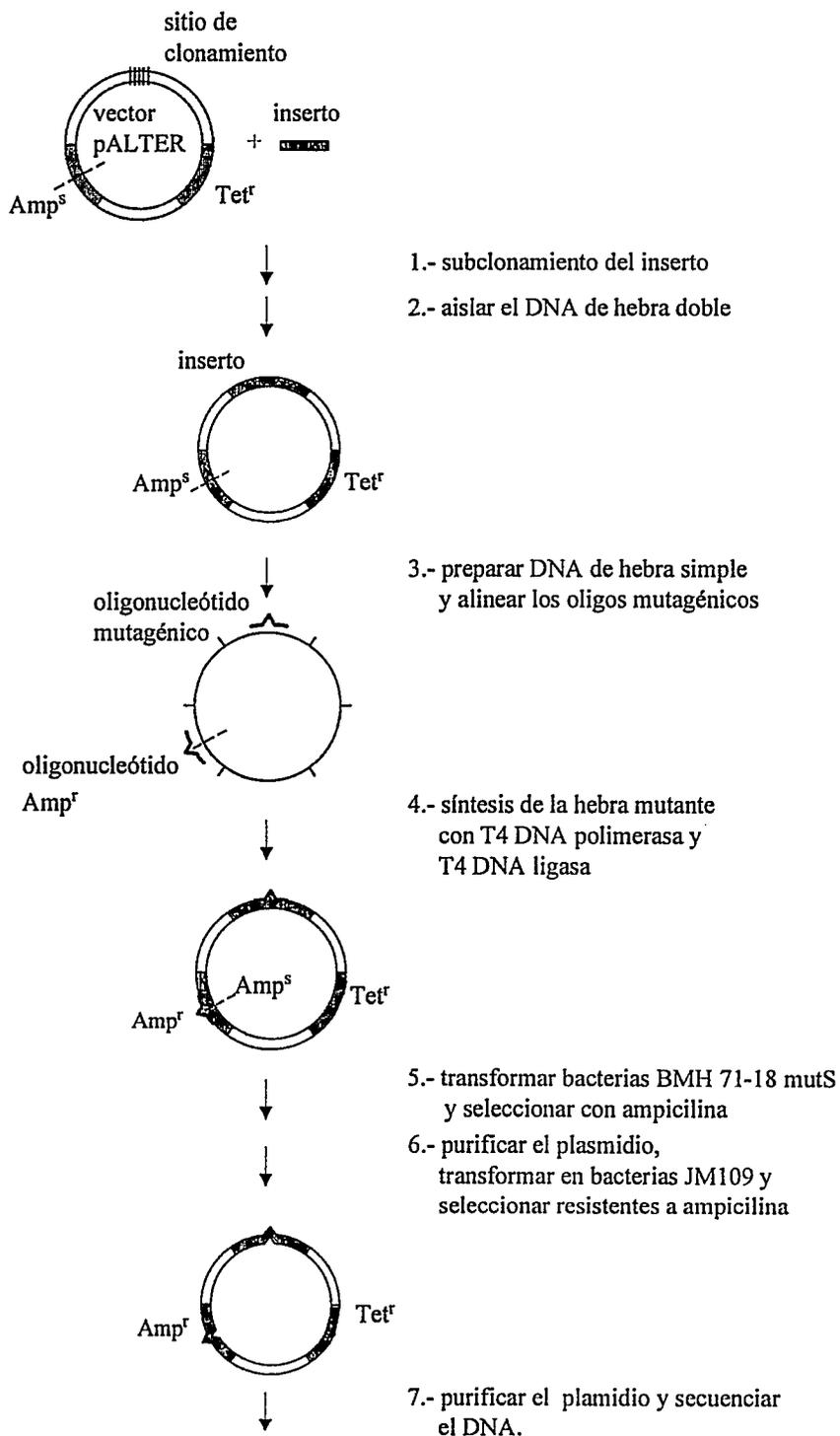


Figura 9. Esquema del sistema de mutagénesis empleando el vector pALTER.

subunidades mutantes que se deseaban ligar en un solo DNA fueron subclonados en estos vectores, llamados protómero A y protómero B, que ya incluían secuencia de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ silvestre (Fig. 10).

1.10.1. Subclonamiento en el protómero A y en el protómero B.

Para subclonar los cDNA de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ con una mutación puntual en el residuo 449, se purificó un fragmento XbaI/SpeI, a partir del vector pAShaker. En una primera digestión se obtiene un fragmento XbaI/XbaI de 1516 pb, ya que el cDNA de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ tiene dos sitios para esta enzima. Luego se efectúa una segunda digestión con SpeI y se obtiene el fragmento XbaI/SpeI de 772 pb, el cual se purifica a partir de un gel de agarosa como fue descrito en la sección 1.6. Por otro lado se obtienen el fragmento XbaI/SpeI (4399 pb) de los vectores protómeros A y B, y se desfosforilan en el extremo 5' para evitar recircularización (ver sección 1.6). Finalmente se ligan los fragmentos XbaI/SpeI del mutante y del vector para obtener el protómero A *ShakerH4* $\Delta 6-46$ mutante y el protómero B *ShakerH4* $\Delta 6-46$ mutante.

1.10.2. Obtención del dímero.

Con el fin de obtener un dímero se introdujo entre los sitios NcoI y Hind III del protómero A, un fragmento de DNA proveniente del protómero B, que contenía la segunda subunidad. De este modo el nuevo plasmidio tiene, bajo el control del

promotor T7, la secuencia de dos subunidades (Fig. 11A), unidas por 27 pb que codifican la secuencia de aminoácidos NNNNNNAMV. De la transcripción *in*

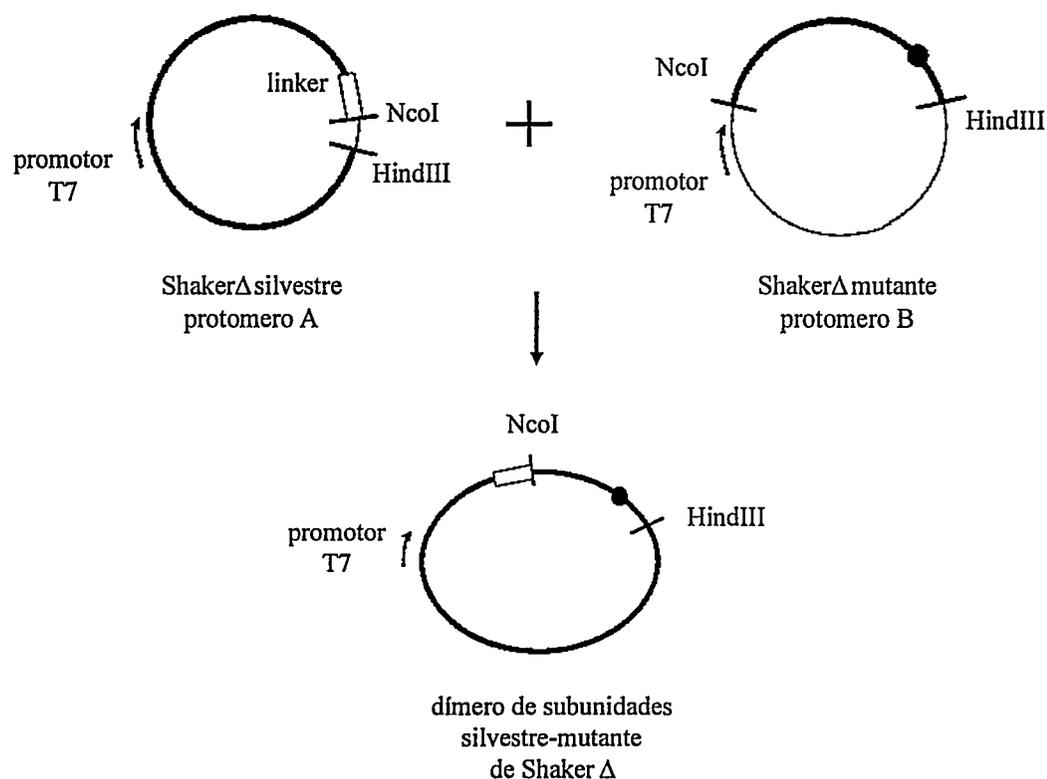


Figura 10. Esquema de la construcción de un dímero de subunidades α del canal *Shaker*H4 Δ 6-46.

Luego de la doble digestión con NcoI y HindIII se purifican los fragmentos dibujados con línea gruesa y se ligan para obtener el dímero. La secuencia de *Shaker* H4 Δ 6-46 en el protómero A se ubica entre el promotor T7 y el linker, en tanto que en el protómero B corresponde a la secuencia entre los sitios NcoI y HindIII dibujada en línea gruesa. El punto en el DNA del protómero B indica la mutación puntual.

in vitro de este DNA se obtiene un RNA que tiene el doble del tamaño del transcripto de una subunidad (5800 pb), como se espera para el caso de un dímero (Fig. 11B).

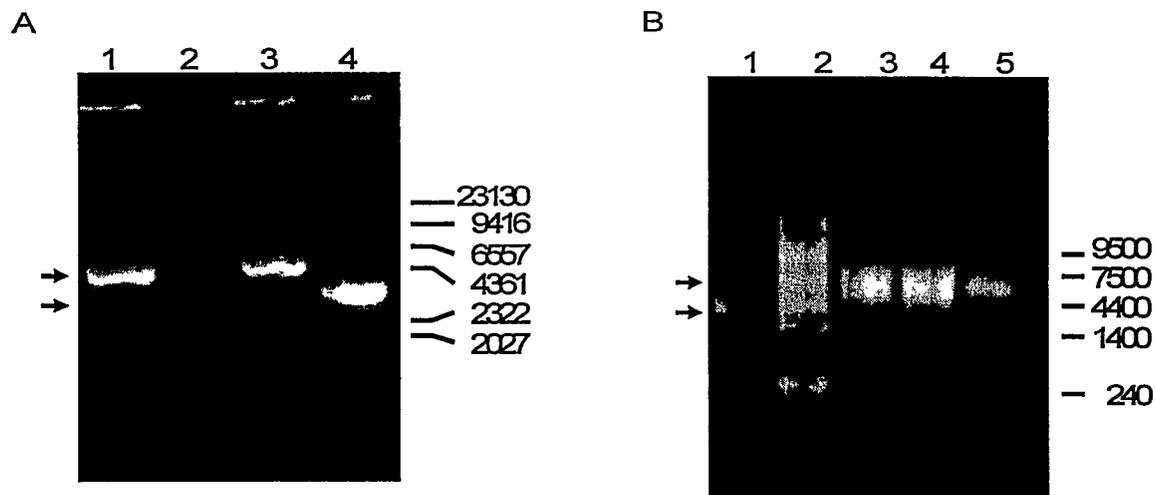


Figura 11. Gel de agarosa con el DNA y el mRNA de un dímero.

(A). DNA linearizados de dímeros de subunidades α del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ (carril 1 y3) y del monómero (carril 4). El marcador de peso molecular λ HindIII se muestra en el carril 2 (en pares de bases). (B). mRNA del monómero (carril 1) y de los dímeros (carril 3-5) de la subunidad α del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$. El marcador de peso molecular "RNA leader" esta en el carril 2 (en pares de bases).

2. *Ranas, oocitos y microinyección.*

2.1. *Ranas.*

Grupos de 7 a 15 ejemplares hembras de la especie *Xenopus laevis* provenientes de Cerro Navia, se mantuvieron en bateas plásticas con 15 a 20 litros de agua potable desclorada, a una temperatura de 18 °C y con obscuridad en forma continua. El agua se descloró almacenándola en toneles de 100 litros y burbujando

aire durante dos a tres días. Las ranas fueron alimentadas dos veces por semana con alimento para anfibios (NASCO, Modesto, CA, USA)

2.2. Oocitos.

Los ejemplares de *Xenopus leavis* se anestesiaron y mediante una incisión abdominal se disecaron uno o dos lóbulos ováricos. Estos últimos se transfirieron a solución OR-2, compuesta de: NaCl 82,5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, ácido 5 N-(2-hydroxyetil) piperazine-N'-2-etanesulfónico (HEPES) 5 mM, pH 7,6. La incisión fue suturada y el ejemplar se colocó en una mezcla de agua y hielo para su recuperación. Con el fin de desfolicular y aislar los oocitos, los lóbulos se cortaron en trozos pequeños y se incubaron en medio OR-2 con 2,5 µg/ml de colagenasa (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), equivalente a ≈ 450 U/ml, por un período de 60 a 90 minutos, a temperatura ambiente y con una agitación orbital de 30 a 60 ciclos por minuto. Posteriormente, los oocitos se lavaron 3 veces en medio OR-2 sin colagenasa y 2 veces en la solución ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,6). Posteriormente los oocitos se colocaron en una placa de Petri con medio ND96 suplementado con gentamicina (50 µg/ml) y se efectuó una primera selección de oocitos de los estados V y VI. Los oocitos mantuvieron a 18 °C.

2.3. *Microinyección.*

Doce a 24 horas después del tratamiento con colagenasa, se efectuó la segunda selección de oocitos, eligiéndose mediante inspección visual aquellos que no tuvieran la membrana de células foliculares. Se microinyectó 10 ng de mRNA en un volumen de 50 nl.

2.3.1. *Procedimiento de microinyección.*

La microinyección se realizó en un equipo consistente de una lupa binocular (Nikon, tipo 201) una fuente de luz con fibra óptica ("FO-150Z", Chiu Technical Corp.; World Precision Instruments (WPI, Sarasota, FL USA), un microinyector ("A203XVY", WPI, Sarasota, FL USA) y un micromanipulador ("M3301R", WPI, Sarasota, FL USA). Las micropipetas de inyección se hicieron estirando capilares de vidrio ("4878", WPI, Sarasota, FL USA) en un estirador horizontal (Sutter Instrument Co., Novato, CA 94948 USA). La punta de la micropipeta se quebró con una pinza bajo el microscopio para obtener puntas de un diámetro de $\approx 20 \mu\text{m}$. Una extensión aproximada de 1 cm medida desde el borde posterior de la micropipeta se llenó con vaselina líquida (M-3516, Sigma Chemical Co. St Louis, MO USA). La micropipeta se insertó en el vástago del microinyector y la vaselina líquida se hizo avanzar hasta la punta. Se succionó entonces un volumen de 1 μl de mRNA, depositado previamente en un trozo de Parafilm ubicado sobre una placa de Petri llena de hielo. Los oocitos se depositaron en una placa plástica que contenía ND96, y se inyectaron inmediatamente.

A la placa se le adhirió una rejilla plástica que permite mantener a los oocitos en una posición fija durante la microinyección.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron 2 a 7 días después de la microinyección. Durante este tiempo los oocitos microinyectados se mantuvieron en ND96 suplementado con gentamicina, a 18 °C.

2.3.2. Estandarización del nivel de expresión y coinyección.

Con el fin de obtener canales que tuviesen subunidades con distintas mutaciones, se coinyectaron los mRNA de dos mutantes o un mutante y el silvestre. Conociendo la proporción inicial de las subunidades y suponiendo una mezcla al azar, se puede predecir las proporciones de los distintos tipos de canales tetraméricos que es posible formar con dos tipos de subunidades ya que se distribuyen en forma binomial. Se comprobó empíricamente que cantidades idénticas de mRNA de distintos mutantes no producen la misma intensidad de corriente iónica. Para estandarizar entonces cantidades de mRNA que den niveles de corrientes iónicas equivalentes, se siguió el protocolo que se describe a continuación. Se inyectaron los mRNA₁ y mRNA₂ por separado y se cuantificó el nivel de corriente (con dos microelectrodos, sección 3.4.1). Se diluyeron los mRNA₁ y mRNA₂ hasta obtener el mismo nivel de corriente con uno u otro. Estas diluciones se emplearon para obtener la expresión de mezclas de subunidades en las proporciones deseadas en los oocitos.

3. Registros electrofisiológicos.

3.1. Pipeta de registro.

Las pipetas de registro se obtuvieron estirando capilares de vidrio con filamento (WPI, 1B100F-4) mediante un estirador horizontal (Sutter Instrument CO, modelo P80-PC). Los microelectrodos así obtenidos tienen una resistencia inferior a 1 M Ω . Los electrodos metálicos se fabricaron con alambre de plata recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl). El recubrimiento se hizo sumergiendo el alambre de Ag en solución de hipoclorito de sodio.

3.2. Soluciones de registro.

3.2.1. Corrientes macroscópicas

Se bañó el oocito con una solución de Na⁺ 140 mM (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,6). En los estudios de bloqueo por tetraetilamonio (TEA) o por Ba²⁺ se reemplazó el ion Na⁺ por el bloqueador. Las pipetas de registro se llenaron con KCl 3 M.

3.2.2. Corrientes de compuerta.

En el caso de los registros de corriente de compuerta las soluciones fueron i) para canales iónicos conductores: solución extracelular: metanosulfonato (MES) de Na⁺ (NaMES) 110 mM, Ca₂MES 2 mM, HEPES 10 mM y ouabaina 0,1 mM

(inhibidor de la bomba de Na^+/K^+). La misma solución se usó para la cámara de guarda. Como medio intracelular se usó NaMES 110 mM y HEPES 10 mM. Para vaciar los oocitos del potasio interno se daban pulsos largos (1 min) a potenciales despolarizantes entre 0 mV y 30 mV, y se iban cambiando las soluciones de todas las cámaras. Posiblemente se logra vaciar los alrededores de los canales. ii) para canales iónicos no conductores: solución extracelular fue metanosulfonato de N-metilglucamina (NMG-MES) 110 mM, Ca_2MES 2 mM, HEPES 10 mM y ouabaina 0,1 mM. La misma solución se usó para la cámara de guarda. Como medio intracelular se usó NMG-MES 110 mM y HEPES 10 mM.

El oocito fue permeabilizado con solución interna a la cual se le agregó saponina 0,1 %.

La pipeta de registro se llenó con una solución de NaMES 2.7 M, NaEGTA 10 mM, NaCl 10 mM, HEPES 10 mM.

3.3. Sistema de registro

Para el registro de las corrientes se empleó el método de potencial controlado (voltage-clamp), en dos modalidades: i) dos microelectrodos (TEV) ii) "cut-open oocyte vaselin gap" (COVG) (Tagialatela y col. 1992). Con ambos métodos de registro se fija el potencial de la membrana del oocito a un potencial de comando V_c . En el primer sistema se registran los canales presentes en todo el oocito, en tanto que en el

segundo sistema se registran los canales presentes en un área determinada (Figura 12) y es posible modificar el medio interno del oocito.

En todos los casos el sistema de registro estuvo compuesto por: un amplificador(DAGAN, CA-1), un osciloscopio de dos canales (Huang Chang 3502), un filtro Bessel, pasa bajo (900, Frequency Devices, Haverhill, MA USA) empleado sólo cuando se registraron corrientes de compuerta, una interfase o tarjeta análogo-digital/digital-análogo (Labmaster, Scientific Solutions Inc.) y un computador AT 486 provisto con programa pCLAMP 5.5 (Axon Instruments, Inc.). La respuesta es almacenada en el computador.

3.3.1. *"Voltage-clamp" de dos microelectrodos .*

Para los registros de dos microelectrodos, se emplearon dos micromanipuladores con los cuales se sostuvieron los cabezales, que comprenden a los amplificadores de retroalimentación y de voltage, y a los cuales se conectan a los microelectrodos. Uno de los microelectrodos mide el potencial de membrana, empleando como referencia el baño extracelular que se conecta a tierra. El segundo microelectrodo inyecta corriente, de modo de mantener el potencial de membrana igual al potencial de comando V_c . De este modo mediante un sistema de retroalimentación es posible fijar el potencial de membrana y al mismo tiempo cuantificar la corriente que está fluyendo a través de la membrana.

3.3.2. *"Cut-open oocyte voltage clamp"*.

Este sistema consta de tres compartimentos: dos extracelulares (de registro y de guarda) y uno intracelular (Figura 12), aislados por sellos de vaselina. El voltaje del compartimento superior o de registro se lleva al potencial de comando mediante el circuito de fijación de voltaje. El compartimento intermedio o de guarda se mantiene al potencial V_c , de modo de aislar eléctricamente la zona de registro y la zona de guarda (no hay flujo de corriente entre estas zonas). El oocito debe ser permeabilizado con saponina en la cámara inferior o intracelular, de modo de poder fijar el potencial intracelular a tierra.

3.4. *Procedimiento de registro.*

El estudio de la inactivación de tipo C se hizo a dos niveles: corriente macroscópica y corriente de compuerta. En el primer caso, se registra la corriente asociada al proceso de conducción de los canales, la cual es producto del flujo de iones a través del poro de conducción de los canales. En el segundo caso, se registra la corriente producida por el movimiento de cargas dentro de la proteína y que está asociada con el proceso de activación del canal.

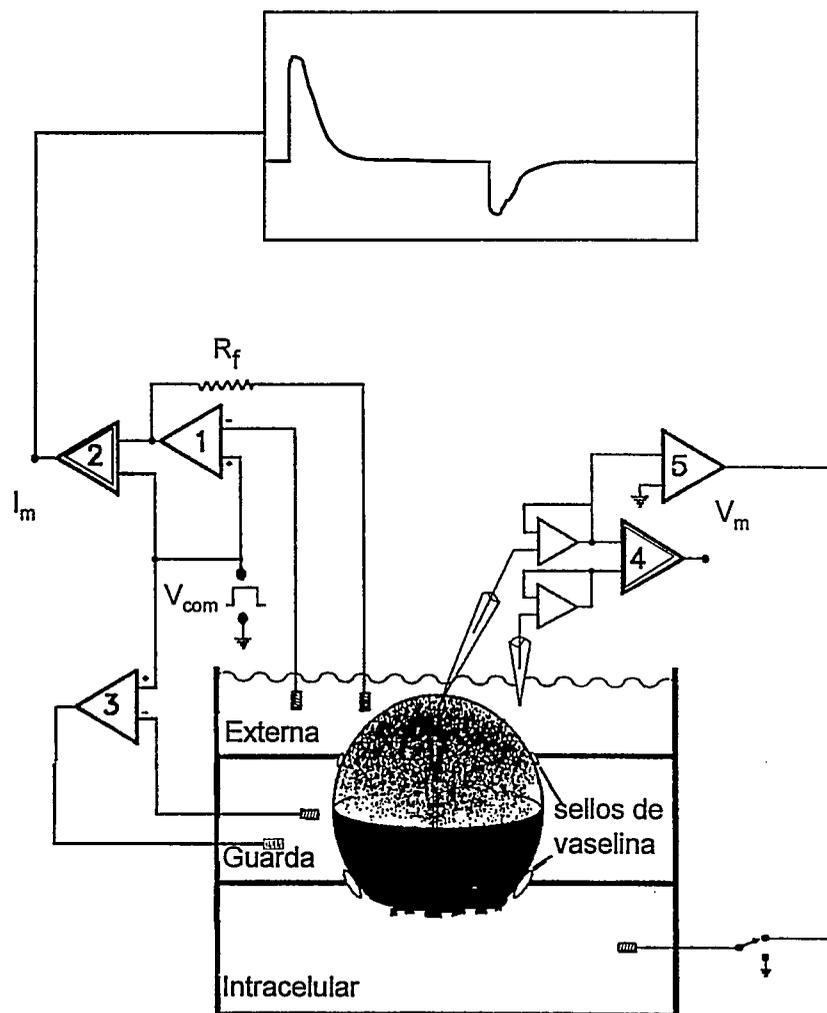


Figure 12. Esquema del sistema de registro "cut-open oocyte voltage clamp".

El oocito se separa en tres zonas aisladas eléctricamente por sellos de vaselina: la cámara externa, la cámara de guarda y la cámara intracelular. El microelectrodo que se inserta en el oocito mide el potencial intracelular en tanto que el otro microelectrodo mide el potencial extracelular. La diferencia de estos dos potenciales es el potencial de membrana (V_m) medido con el amplificador diferencial marcado con el número 4. El amplificador operacional 5 mantiene a tierra activamente la cámara intracelular, que esta en contacto directo con el interior del oocito, por lo que el potencial intracelular se lleva a tierra.

El amplificador operacional 1 fija el potencial en la cámara externa al potencial de comando (V_{com}) inyectando corriente a través de la resistencia de retroalimentación R_f . El amplificador operacional 3 fija el potencial de la cámara de guarda a V_{com} . Con esto se evita el flujo de corriente que se produciría por un sello de vaselina imperfecto entre la cámara externa y la de guarda. El amplificador diferencial 2 mide la corriente que pasa a través de la membrana (I_m) (figura modificada de Taglilatelá y col., 1992).

3.4.1. *Registro de corriente macroscópica:*

Los registros de corrientes macroscópicas fueron obtenidos usando como sistema de fijación de voltaje el TEV. Se describirá muy brevemente el procedimiento experimental: **i.** Fijar en 0 mV el electrodo del baño extracelular **ii.** Colocar ambos microelectrodos en el baño y fijarlos en 0 mV **iii.** Introducir los microelectrodos en el oocito. En esta etapa ambos microelectrodos están midiendo el potencial de membrana **iv.** Activar la fijación de voltaje o clamp, de modo de fijar el potencial de membrana al potencial Vc. **v.** Luego, controlado mediante el computador, se pueden dar los protocolos de pulsos deseados y registrar los cambios en la corriente que estos inducen.

El medio extracelular en estos registros fue ND96 o la solución 140 mM Na⁺. La solución extracelular se cambió perfundiendo por gravedad la cámara externa (de 800 µl) con 10 ml de solución. Cuando se estudió el bloqueo extracelular por tetraetilamonio (TEA) o Ba²⁺ se lavó con la solución control entre cada concentración de bloqueador de modo de verificar la recuperación total de la corriente. Los microelectrodos fueron llenados con KCl 3 M.

3.4.2. *Registro de corriente de compuerta.*

Para registrar las corrientes de compuerta se empleó el COVG (Stefani y col., 1994), en condiciones en las cuales no hay conducción iónica de K⁺ y existe una gran

expresión de canales. Existen algunos mutantes de Shaker que no tienen conducción iónica y permiten medir directamente las corriente de compuerta. En los casos que los canales si tienen conducción además de usar un medio extracelular sin potasio, es necesario eliminar el potasio intracelular.

El procedimiento experimental fue el siguiente: **i.** Se puso el oocito sobre la cámara intermedia y se colocó sobre el la cámara superior (Figura 12). La corriente capacitiva decae ahora con dos exponenciales, donde la segunda corresponde a la capacidad de la membrana del oocito **ii.** Se activó el clamp de la cámara de guarda y se compensó la corriente de fuga (producida por el sello imperfecto entre las cámaras y el oocito) **iii.** Se retiró la solución de la cámara inferior y se reemplazó por saponina 0,1 %. A medida que la saponina permeabiliza la membrana del oocito la segunda exponencial de la caída de la corriente capacitiva se hace más lenta. **iv.** Se removió la saponina y se lavó con solución interna **v.** Se introdujo el microelectrodo en el oocito (en esta etapa se puede leer el potencial de membrana) **vi.** Se activó el clamp, para fijar el potencial a V_c tanto en de la cámara de registro como en la cámara de guarda. **vii.** Se compensó la corriente capacitiva **viii.** Se dió el protocolo de pulsos deseado y registrar.

Cuando fue necesario eliminar el potasio intracelular para poder registrar corrientes de compuerta, se siguió el mismo procedimiento. Sin embargo, antes de hacer los registros, se fijó el potencial de membrana a 0 mV por períodos largos recuperando los canales de la inactivación lenta fijando el potencial a -100 mV por 2 min. Al mismo tiempo se iban reemplazando la solución de las cámaras externa, de

guarda e intracelular. De este modo en 20 a 30 minutos se eliminan las corrientes iónicas, pudiéndose registrar la corriente de compuerta.

La dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta en canales cerrados o en canales inactivados tipo-C, se estudió con el siguiente protocolo de pulsos: i. canales cerrados, el potencial de mantención fue $H_p = -90$ mV y los pulsos de prueba (de 30 ms de duración) desde -70 mV hasta + 40 mV cada 10 mV ii. inactivados tipo-C, el potencial de mantención fue $H_p = 0$ mV y los pulsos de prueba (de 30 ms de duración) desde -10 mV hasta -160 cada 10 mV. De este modo estudiamos la dependencia del movimiento de las cargas de compuerta Q cuando los canales van desde el estado cerrado (en el cual el sensor de potencial esta en una posición que llamaremos de "reposo") al estado abierto (donde el sensor esta en una posición que llamaremos "permisiva") con el primer protocolo, en tanto que con el segundo se estudia la dependencia del potencial cuando el sensor va desde la posición "permisiva" hasta la posición de "reposo". Se comparó la dependencia del potencial del movimiento del sensor en canales cerrados o inactivados tipo-C en presencia de Ca^{2+} 2 mM o Ba^{2+} 2 mM en la solución externa.

4. Adquisición y análisis.

4.1. Corrientes macroscópicas.

4.1.1. Cinéticas de inactivación y recuperación de la inactivación.

La cinética de inactivación del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ silvestre o de los mutantes fue estudiada dando un pulso a 0 mV por 20 s, desde un potencial de mantención o potencial de "holding" (Hp) de -100 mV. El tiempo característico de inactivación, τ_i , se obtuvo al ajustar el decaimiento de la corriente con una exponencial (ec. 1) (en la mayoría de los casos) o con la suma de dos exponenciales cuando fue necesario,

$$I(t) = I(0) [P + (1-P) \exp(-t/\tau_i)] \quad (\text{ec. 1})$$

donde $I(t)$ es la corriente al tiempo t , $I(0)$ la corriente inicial, y P la fracción de corriente que no se inactiva.

La cinética de recuperación de la inactivación se obtuvo con los siguientes protocolos: **A.** i. Un prepulso a 0 mV (de duración suficiente para inactivar los canales) ii. Un período de recuperación a -100 mV iii. Un pulso de prueba a 0 mV para estimar la fracción de la corriente recuperada. Este protocolo se repitió a un intervalo que asegurara la recuperación total de los canales y variando el tiempo que media entre la repolarización y el pulso de prueba. **B.** i. Se despolariza la membrana a 0 mV para inactivar los canales ii. se repolariza a -100 mV, y cada 200 ms se aplicó un pulso de prueba muy breve (8 ms) a 0 mV para determinar la fracción de corriente

que se había recuperado. El tiempo característico de recuperación de la inactivación, τ se obtuvo al ajustar la recuperación de la corriente a una exponencial de la forma

$$I(t) = I_{\infty} (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (\text{ec. 2})$$

donde I_{∞} es la corriente final que se recuperó.

4.1.2. Coinyección de subunidades y mezcla al azar.

Con el fin estudiar la participación de las subunidades en la inactivación de tipo C, se obtuvieron canales formados por dos subunidades distintas coinyectando los mRNA de subunidades con distintas mutaciones puntuales. Al coinyectar dos tipos de mRNA se obtienen canales formados por distintas proporciones de las subunidades que codifican. Si la mezcla ocurre al azar, la proporción en la cual se encuentran estas subunidades en el canal depende de la proporción en que se coinjectaron los mRNA, pudiendo ser descrita por una distribución binomial. MacKinnon en 1991 demostró que canales con el extremo N terminal suprimido y canales silvestre *ShakerH4* eran tetrámeros y que las subunidades se mezclaban al azar. En nuestro caso las diferencias entre las subunidades coinjectadas es solamente un cambio puntual del el residuo aminoacídico en la posición 449.

Podemos entonces predecir la proporción de las distintas clases de canales formados, aplicando la distribución binomial

$$P_i = \frac{n!}{i!(n-i)!} (f_1)^i (f_2)^{n-i} \quad (\text{ec. 3})$$

donde P_i es la probabilidad de tener un canal con i subunidades de tipo 1, n es el número de subunidades (en este caso 4), f_1 la fracción de subunidades del tipo 1 y f_2 la fracción de subunidades de tipo 2. Los cambios en las proporciones obtenidas al variar las fracciones relativas de las subunidades se muestra en la figura 13.

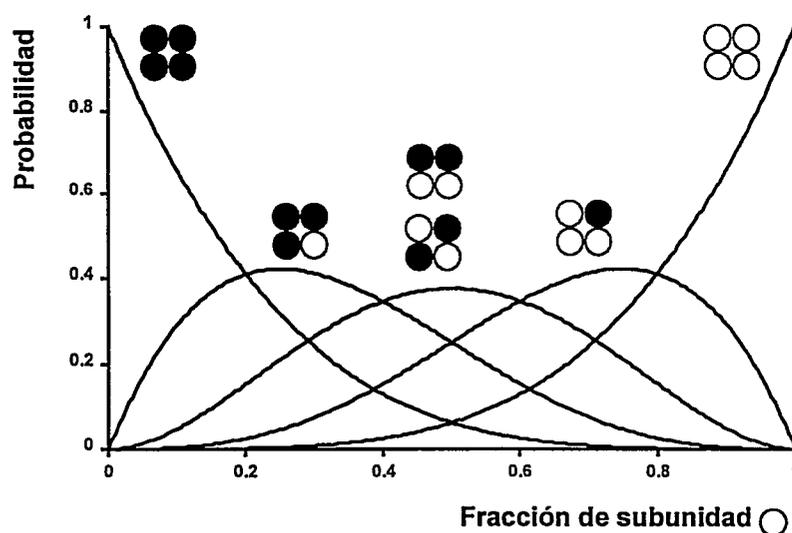


Figura 13. Esquema de las proporciones esperadas para distintos canales formados por dos subunidades diferentes.

La abscisa representa la fracción inyectada de subunidades de tipo ○.

Si las subunidades se comportan en forma independiente y basta que una se inactive para que se detenga el flujo iónico, la constante de tiempo de inactivación del canal (τ) es inversamente proporcional al número de subunidades que se inactivan,

$$\tau = \tau_{\text{subunidad}} / n \quad (\text{ec. 4})$$

donde $\tau_{\text{subunidad}}$ es la constante de tiempo de inactivación de una subunidad y n el número de subunidades que se inactivan.

y la cinética de una mezcla de subunidades, una de las cuales se inactiva muy rápido en comparación a otra que prácticamente no se inactiva, esta descrita por

$$I = P_0 + \exp(-t/\tau) P_1 + \exp(-2t/\tau) P_2 \quad (\text{ec. 5}) \\ + \exp(-3t/\tau) P_3 + \exp(-4t/\tau) P_4$$

donde $\tau/4$ es la constante de tiempo de la inactivación del canal homotetramérico formado por subunidades rápidas y P_i la probabilidad de un canal con i subunidades T449S.

4.1.3. Bloqueo por bario.

i. bloqueo del estado inactivado tipo-C: para demostrar el bloqueo por Ba^{2+} de los canales inactivados tipo-C, se usó el siguiente protocolo: los canales fueron inactivados aplicando por 2 min un pulso despolarizante (V_{depol}), usualmente 0 mV, a partir de un potencial $H_p = -100$ mV. Se expuso luego el oocito a una solución con Ba^{2+} por tiempos variables (t_{Ba}). Después de este período, el oocito se lavó con una solución libre de Ba^{2+} por períodos variables (t_{lavado}), indicados en las figuras y en el texto. La membrana fue repolarizada a -100 mV y la corriente de salida $I(t)$ medida al final del pulso de prueba de 15 ms a 0 mV aplicado cada t_{test} segundos. La cinética de salida del Ba^{2+} de los canales bloqueados fue obtenida siguiendo el curso temporal de la corriente normalizada, y descrita por una función exponencial. La fracción de canales no bloqueados por Ba^{2+} ($I_{\text{fraccional}}$), fue estimada como la fracción $I(t_0)/I(\text{control})$, donde $I(t_0)$ es el valor extrapolado a $t=0$, luego de ajustar la salida del Ba^{2+} a una exponencial

simple, y $I(\text{control})$ la corriente medida en ausencia de Ba^{2+} . La cinética de entrada se obtuvo al graficar los datos $I_{\text{fraccional}}$ en función del tiempo de exposición a Ba^{2+} y se ajustaron con la ecuación

$$I_{\text{fraccional}} = (1-C) \exp^{-t/t_{\text{on}}} + C \quad (\text{ec. 6})$$

donde t_{on} es la constante de tiempo del bloqueo por Ba^{2+} y C la fracción de corriente que no se bloquea.

ii. Dosis-respuesta de la unión de Ba^{2+} : la curva dosis-respuesta para la unión del bario a canales inactivados tipo-C se efectuó usando $[\text{Ba}] = 8, 20, 35$ y 70 mM, con $t_{\text{Ba}} = 300$ s, $t_{\text{lavado}} = 300$ s y $t_{\text{test}} = 5$ s. La tasa de entrada de Ba^{2+} a canales inactivados tipo-C (k_{on}) fue medida usando $[\text{Ba}] = 8, 20$ y 35 mM, con $t_{\text{Ba}} = 2, 5, 10, 15, 20$ y 45 min, $t_{\text{lavado}} = 300$ s y $t_{\text{test}} = 5$ s.

iii. Salida de Ba^{2+} : los experimentos diseñados para medir la tasa de salida de Ba^{2+} de los canales en estado inactivado tipo-C fueron efectuados con $[\text{Ba}] = 20$ mM, $t_{\text{Ba}} = 300$ s, $t_{\text{lavado}} = 300$ s y $t_{\text{test}} = 0,5, 2$ y 5 s.

iv. Dependencia del potencial de la unión de Ba^{2+} : La dependencia del potencial de la tasa de unión de Ba^{2+} a canales inactivados tipo-C fue determinada comparando las curvas dosis-respuesta a tres potenciales distintos ($V_{\text{depol}} = -20, 0$ or 30 mV) y $t_{\text{Ba}} = 15$ min, $t_{\text{lavado}} = 5$ min y $t_{\text{test}} = 5$ s.

v. Bloqueo del estado abierto por bario: se estudio el bloqueo por Ba^{2+} de la fracción de corriente que no se inactiva. Los datos de inhibición de la corriente por Ba^{2+} fueron

ajustado (por minimización de la suma de los cuadrados de las diferencias) a la ecuación

$$\text{Inhibición} = 1 - (I_{Ba}/I_o) = [Ba]^N / ([Ba]^N + K_d^N) \quad (\text{ec. 7})$$

donde I_{Ba} es la corriente no bloqueada por Ba^{2+} , I_o es la corriente que se produce en respuesta a pulsos test en presencia de Ba^{2+} (ver punto *i* de esta misma sección), K_d la constante de disociación aparente y N es el coeficiente de Hill. La dependencia del potencial del bloqueo por Ba^{2+} de canales abiertos se determinó midiendo la K_d a -30, -15, 0 y 15 mV.

4.2. Corrientes de compuerta.

El análisis de los registros de las corrientes de compuerta se efectuó con el programa CLAMPFIT 6.0 (pCLAMP 6.0, Axon Instruments, Inc.). Las corrientes de compuerta I_g , tanto la que se produce cuando el sensor se mueve desde la posición inicial a la final ("on") como la que se produce por el retorno desde la posición final a la inicial ("off"), fueron integradas en función del tiempo obteniéndose la carga de compuerta Q . Se verificó que la carga máxima que se mueve en el "on" fuese igual a la carga máxima del "off" ($Q_{on} = Q_{off}$).

Se normalizó la carga de compuerta respecto a la carga máxima movilizada cuando era posible alcanzar la saturación de la curva Q en función del potencial ($Q(V)$). Cuando no se obtenía la saturación, porque no era posible alcanzar los potenciales a los cuales esto ocurriría, se supuso conservación de la carga y se

normalizó respecto a las curvas con $H_p = -90$ mV. Al estudiar las corrientes de compuerta partiendo con los canales en estado inactivado tipo-C el “on” es una corriente de entrada (según la convención empleada), por lo que la carga tiene signo negativo. Con el fin de facilitar la comparación de las curvas $Q(V)$ con la condición inicial los canales cerrados y condición inicial los inactivados tipo-C, se transformaron todos los datos de carga de compuerta a valores absolutos.

Las curvas $Q(V)$ fueron ajustadas con la suma de dos distribuciones de Boltzmann (Olcese y col., 1997)

$$Q(V) = \frac{q_1}{1 + \exp[-z_1 e (V-V_1)/kT]} + \frac{q_2}{1 + \exp[-z_2 e (V-V_2)/kT]} \quad (\text{ec.8})$$

donde q_1 y q_2 son las fracciones relativas de cada una de las dos distribuciones, z_1 y z_2 la carga que se mueve en cada una estas etapas ($z_1 + z_2$, es la carga total movilizada), V_1 y V_2 los voltajes medios de las distribuciones y V el potencial del pulso de prueba. Se efectuó el ajuste simultaneo de todas las curvas, empleando los mismos parámetros z_1 y z_2 en todos los casos, para estimar los parámetros V_1 , V_2 y q_1 , q_2 .

4.3. Modelos cinéticos.

El ajuste de las curvas y los modelos cinéticos fueron hechos usando tanto el programa Excel v 7.0 (Microsoft) como Nfit (The university of Texas, Galveston, TX).

RESULTADOS

1. *Características generales de la inactivación tipo C en canales de potasio*

ShakerH4 Δ6-46.

En el canal silvestre la inactivación de tipo C se caracteriza por ser un proceso lento en relación a la inactivación de tipo N, siendo posible obtener canales con distintas cinéticas de inactivación tipo C en mutantes puntuales. Con el fin de poder comparar el efecto de las mutaciones o bloqueadores sobre el proceso de inactivación de tipo C se describirá muy brevemente el comportamiento cinético de la inactivación y su recuperación en los canales *ShakerH4 Δ6-46*.

1.1. *Cinética de inactivación.*

Cuando la membrana plasmática es despolarizada, pasando de un potencial de -100 a uno de 0 mV se observa una corriente iónica inducida por la apertura del canal (inserto, Fig. 14). Si el potencial se mantiene en 0 mV los canales se inactivan esto se refleja en una disminución de la corriente (Fig. 14).

Se efectuaron registros de corriente con dos microelectrodos, en condiciones en las cuales se observaban corrientes de salida (el potasio sale desde el oocito cuando hay potenciales positivos) las cuales por convención tienen signo positivo. La corriente

decae exponencialmente, y es caracterizada por un τ_i y una fracción de corriente que no se inactiva o pedestal (P), de acuerdo a la ecuación descrita en métodos:

$$I(t) = I(0) [P + (1-P) \exp(-t/\tau_i)] \quad (\text{ec. 1})$$

donde $I(t)$ es la corriente al tiempo t , $I(0)$ la corriente inicial.

El τ_i para el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ es de 4000 ± 340 ms y la fracción de corriente que no se inactiva P es $0,12 \pm 0,017$ % ($n = 7$).

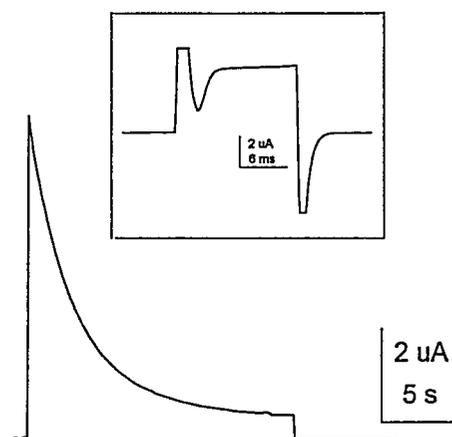


Figura 14. Cinética de inactivación de tipo C en el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$.

Inserto. Activación del canal en respuesta a un pulso desde -100 mV a 0 mV de 15 ms. (se observa una corriente capacitiva que antecede a la corriente iónica)

Los canales se abren en respuesta a pulso de potencial despolarizante (a 0 mV por 20 s, desde un $H_p = -100$ mV) y luego se inactivan, con un $\tau_i = 4$ s.

La inactivación tipo C es independiente del potencial en el rango de -20 a 50 mV (Hoshi y col., 1991), puesto que no se observan variaciones en las cinéticas de inactivación con el voltaje obteniéndose un promedio para τ_i alrededor de 4 s.

1.2. Cinética de recuperación de la inactivación.

Cuando el potencial de membrana se repolariza, es decir se vuelve al potencial de mantención, los canales se recuperan de la inactivación de tipo C retornando a la conformación cerrada. El proceso de recuperación de la inactivación se caracterizó luego de inactivar los canales y volver al potencial de mantención, dando pulsos muy breves a 0 mV, de modo de ir verificando la cantidad de corriente que se recupera en el tiempo (protocolo B, descrito en la sección 4.1.1). La figura 15 nos muestra que la recuperación de la inactivación de tipo C tiene dos componentes. El componente más rápido no pudo ser determinado ya que se desarrolla completamente en un tiempo menor que el intervalo usado entre los pulsos de prueba (200 ms). Este componente rápido corresponde al 20 % de la corriente total. El componente lento se ajustó con una exponencial:

$$I(t) = I_{\infty} (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (\text{ec. 2})$$

donde I_{∞} es la corriente final que se recuperó. En nuestro caso la corriente se ha normalizado y la constante de tiempo τ obtenida del ajuste es de 1,5 s (Fig. 15).

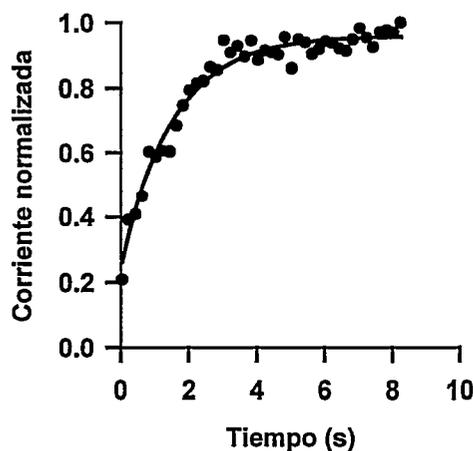


Figura 15. Cinética de recuperación de la inactivación de tipo C del canal de potasio *ShakerH4 Δ6-46*.

La recuperación fue medida, desde un potencial $H_p = -90$ mV, con pulsos de prueba de 8 ms a 0 mV, cada 200 ms. El componente lento se ajustó con una exponencial con un τ de 1,5 s.

2. *Participación de las subunidades α en el proceso de inactivación de tipo C.*

El proceso de inactivación de tipo C podría ser explicado de dos modos : i. Las subunidades actúan en forma independiente y basta la modificación conformacional de una sola subunidad para que el canal se inactive. ii. Las subunidades actúan en forma concertada (cooperativa) y varias o todas deben llegar al estado inactivado para que el canal se inactive. En el primer caso la subunidad que sufre el cambio más rápido determinaría el tiempo que demora el canal en inactivarse. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se estudiaron canales formados por dos subunidades distintas, las cuales se ensamblan en canales heterotetraméricos. Estas subunidades, que tienen diferentes mutaciones puntuales en la región del poro, en los canales homotetraméricos (formados por un sólo tipo de subunidad) presentan distintas cinéticas de inactivación de tipo C, las que también difieren de la del canal silvestre.

Para obtener canales formados por dos tipos de subunidades se siguieron dos estrategias: i. coinyección de los mRNA que codifican estas subunidades ii. expresión de dímeros.

2.1. *Coinyección de subunidades.*

Al coinyectar el mRNA de dos tipos de subunidades (dos mutantes o un mutante y el silvestre) se obtienen distintas clases de canales, cada una de ellas formada por distinto número de una y otra subunidad. Si las subunidades se mezclan al azar se puede predecir la proporción de cada una de estas clases usando una

distribución binomial (ec. 3). Los mutantes puntuales que se coinyectaron se eligieron según las características de cinética de inactivación tipo C del canal homotetramérico, mezclándose subunidades que confieren cinéticas de inactivación muy rápidas (τ_i de pocos milisegundos) y subunidades que confieren cinéticas de inactivación muy lentas (τ_i del orden de los segundos).

2.1.1. Mezcla de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449S y *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449Y.

Se escogieron estos mutantes dadas sus características cinéticas del proceso de inactivación en ellos. El canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ con una sustitución de la treonina 449 por una serina (T449S) presenta una cinética de inactivación de tipo C muy rápida, caracterizada por un τ_i de 81 ± 10 ms ($n=3$) (Fig 16A). Por otra parte, el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ con la sustitución de la treonina 449 por tirosina (T449Y) tiene una cinética de inactivación de tipo C muy lenta, con un τ_i de 13011 ± 3400 ms ($n = 11$) (Fig. 16B). En ambos casos los ajustes fueron hechos con una función monoexponencial más un pedestal de corriente que no se inactiva (ec. 1), aunque en el caso de T449S el pedestal es prácticamente inexistente. La proporción en la cual se coinyectaron los mRNA (diluidos según la eficiencia con que se expresan, ver métodos 2.3.2) de estas subunidades fue de 3 T449S : 1 T449Y, de modo de obtener prácticamente todos los canales con al menos una subunidad T449S.

Las fracciones esperadas de cada uno de los diferentes tipos de canales (P_i) según la distribución binomial (ec. 3) es la siguiente:

# subunidades T449S	# subunidades T449Y	P_i
0	4	0,004
1	3	0,048
2	2	0,211
3	1	0,422
4	0	0,316

A diferencia de los canales homotetraméricos, la cinética obtenida de la coinyección de estas subunidades debió ser ajustada con la suma de dos exponenciales (Fig. 16C), cuyas constantes de tiempo son un $\tau_{i1} = 158 \pm 3\text{ms}$ y $\tau_{i2} = 1764,7 \pm 690\text{ms}$ ($n = 3$).

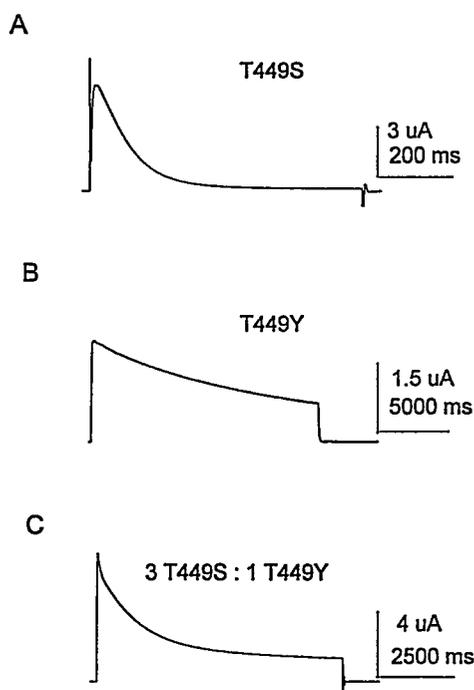


Figura 16. Cinéticas de inactivación tipo C de canales obtenidos a partir de una mezcla de subunidades.

Se dio un pulso despolarizante a 0 mV, a partir de un $H_p = -90\text{mV}$ por los tiempos indicados. La cinética se ajustó con una o dos exponenciales y las constantes de tiempo obtenidas fueron (A) T449S: $\tau_i = 81 \pm 10\text{ms}$ (B) T449Y: $\tau_i = 13011 \pm 3400\text{ms}$, $P = 0,30 \pm 0,07$ (C) mezcla 3 T449S:1T449Y: $\tau_{i1} = 158 \pm 3\text{ms}$ (amplitud 13 %), $\tau_{i2} = 1764,7 \pm 690\text{ms}$ (amplitud 67 %), $P = 0,20$.

Si las distintas subunidades no se mezclaran, es decir no formarían heterotetrámeros, la cinética obtenida sería la suma de las cinéticas de los canales homotetraméricos en las proporciones en que fueron inyectados los mRNA diluidos para que se expresen en forma equivalente. Al comparar la cinética que se predice en este caso con la obtenida experimentalmente (Fig. 17) se observa una diferencia notable indicando que las subunidades no se están segregando, sino que mezclando.

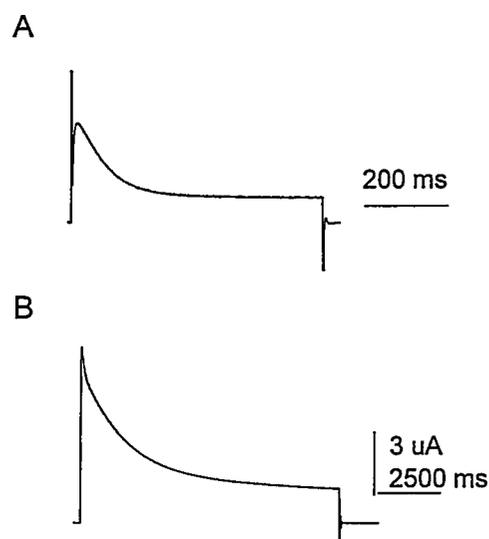


Figura 17. Las distintas subunidades se mezclan entre ellas.

(A) Cinética que se predice para subunidades que no se mezclan. Se sumaron la corriente normalizada de T449S multiplicada por un factor de 0,75 más la corriente normalizada de T449Y multiplicada por un factor de 0,25. (B) Corriente obtenida experimentalmente de la mezcla de subunidades 3 T449S: 1 T449Y.

2.1.2. Mezcla de *ShakerH4 Δ6-46* y *ShakerH4 Δ6-46 T449Y*.

Los canales homotetraméricos formados por subunidades silvestres (WT) para la inactivación de tipo C se caracterizan por un τ_i de 4 s (Fig. 18A y sección 1.1), y como se mencionó anteriormente los canales T449Y tienen un τ_i de 13 s (Fig. 18B). En este caso la coinyección se hizo en una proporción de 2 WT: 1

T449Y y las fracciones esperadas para las distintas clases de canales según la distribución binomial es

# subunidades WT	# subunidades T449Y	Pi
0	4	0,012
1	3	0,098
2	2	0,296
3	1	0,395
4	0	0,197

La cinética de inactivación de esta mezcla se ajustó con una función monoexponencial con un $\tau_i = 9950 \pm 900$ ms ($n = 12$) (Fig. 18C), que es un valor intermedio respecto a las constantes de tiempo de los canales homotetraméricos.

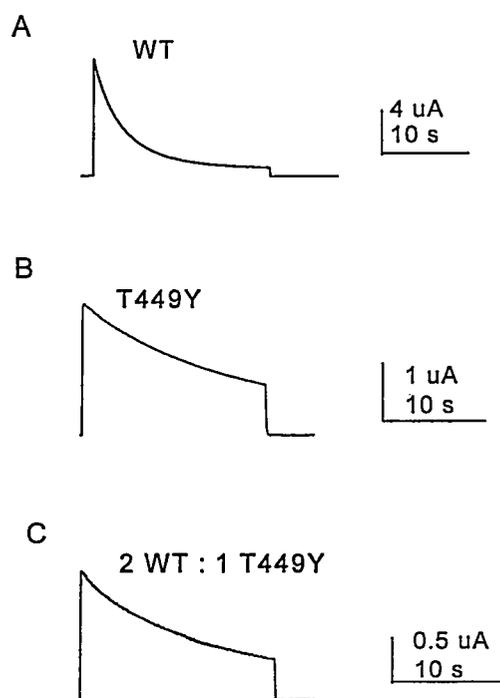


Figura 18. Cinéticas de inactivación tipo C de la mezcla 2 WT: 1 T449Y. Se despolarizó la membrana a 0 mV, a partir de un $H_p = -90$ mV, y la caída de la corriente fue ajustada con una función exponencial con una constante de tiempo de (A) WT: $\tau_i = 4000 \pm 340$ ms, $P = 0,12 \pm 0,017$. (B) T449Y: $\tau_i = 13011 \pm 3400$ ms., $P = 0,30 \pm 0,07$. (C) mezcla 2 WT :1T449Y: $\tau_i = 9950 \pm 900$ ms, $P = 0,35 \pm 0,06$.

2.1.3. *Ninguna de las subunidades determina por si sola la cinética de inactivación.*

Si suponemos que las subunidades son independientes y basta que una sola de ellas se inactive para que se detenga el flujo de corriente iónica, podemos pensar que la subunidad que se modifica con mayor rapidez determina la cinética de inactivación de un canal heterotetramérico. En este caso y cuando los canales están constituidos por la mezcla de una subunidad que forma canales que prácticamente no se inactivan y otra que produce canales que se inactivan rápidamente, la cinética queda descrita por la ecuación 5:

$$I = P_0 + \exp(-t/\tau) P_1 + \exp(-2t/\tau) P_2 \quad (\text{ec. 5})$$

$$+ \exp(-3t/\tau) P_3 + \exp(-4t/\tau) P_4$$

donde $\tau/4$ es la constante de tiempo de la inactivación del canal homotetramérico formado por subunidades rápidas y P_i la probabilidad de un canal con i subunidades T449S.

Los resultados demuestran que a medida que se aumenta el número de subunidades rápidas el τ se hace más pequeño. En la coinyección de T449S y T449Y, donde la diferencia en la cinética de inactivación es de 4 ordenes de magnitud, podemos emplear la ecuación 5 para predecir el curso temporal de la corriente.

En la figura 19 se muestran la cinética calculada (A) y la cinética de la mezcla (B), observándose una diferencia notoria lo que nos lleva a descartar que la subunidad

que forma canales homotetraméricos con inactivación rápida determine la cinética de inactivación del canal.

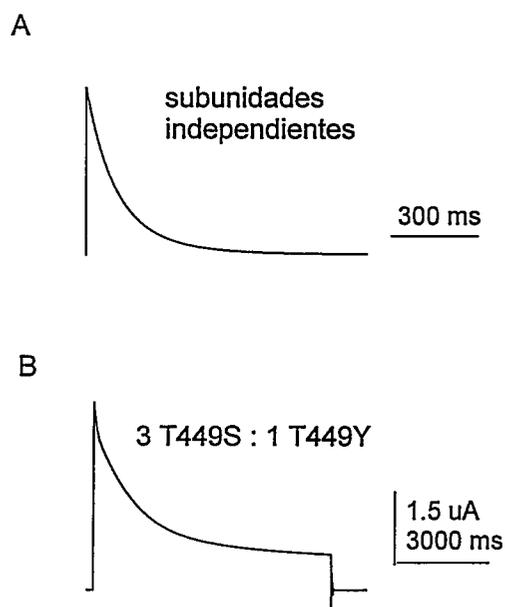


Figura 19. El modelo de subunidades independientes no explica los resultados. (A) Cinética predicha del modelo de subunidades independientes, donde el canal homotetramérico de la subunidad de inactivación rápida tiene un $\tau_i = 80$ ms. (B). Cinética obtenida experimentalmente de la mezcla 3 T449S: 1 T449Y, con $\tau_{i1} = 158. \pm 3$ ms y $\tau_{i2} = 1764,7 \pm 690$ ms.

En conclusión, ninguna de las subunidades determina por si sola la cinética de inactivación.

2.2. Dímero de subunidades.

Intentando dilucidar el rol de una subunidad en el proceso de inactivación de tipo C y con el fin de tener una sola clase de canales en el oocito, se construyeron dímeros de subunidades. De esta forma se obtienen canales formados por dos tipos de subunidades. En este caso se inyecta el mRNA de dímeros de subunidades, el cual se traduce en una sola cadena polipeptídica con dos subunidades del canal *ShakerH4* $\Delta 6$ -

46, y al ensamblarse dos de ellos forman un canal funcional. Por ejemplo, si una de las subunidades del dímero es silvestre y la otra mutante, se obtienen canales con dos subunidades silvestres y dos mutantes.

El primer dímero que construimos fue *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449S- *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449Y. No se logro registrar corriente iónica en los oocitos inyectados con este mRNA por lo cual pensamos que este dímero no forma canales funcionales.

2.2.1. Dímero *ShakerH4* $\Delta 6-46$ - *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449Y.

El canal resultante de la inyección del mRNA del dímero WT-T449Y tiene dos subunidades silvestres y dos subunidades (T449Y) lentas para la inactivación de tipo C. La cinética de inactivación de estos canales se ajustó con una exponencial con un τ de 5213 ± 1100 ms ($n = 12$) (Fig. 20). Esta constante de tiempo es menor que la obtenida para la mezcla 2 WT : 1 T449Y, en la cual un 30 % de los canales equivalen a este dímero (2 subunidades WT y 2 subunidades T449Y).

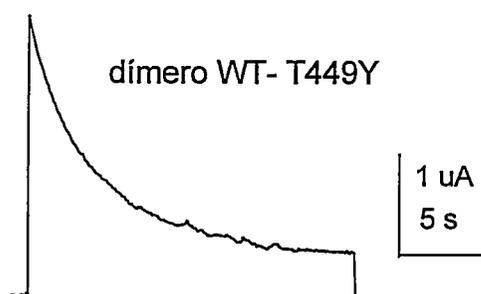


Figura 20. Cinética de inactivación de los canales formados por el dímero WT-T449Y.

La caída de la corriente es una función monoexponencial con un $\tau = 5213 \pm 1100$ ms, $P = 0.16$.

En este caso se pudo comprobar que el canal formado por dos subunidades de distinto tipo tiene un comportamiento cinético intermedio con respecto a los canales homotetraméricos.

2.2.2. El orden de las subunidades no modifica el comportamiento del canal.

El mRNA del dímero con las subunidades en el orden contrario (*ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449Y- *ShakerH4* $\Delta 6-46$) fue construido, transcrito in vitro y microinyectado. Sin embargo, no fue posible detectar corrientes iónicas. Para verificar que el orden de las subunidades no afecta el comportamiento del canal (ver Isacoff y col., 1990), se construyó el dímero WT-T449C y el dímero T449C-WT. En el caso del canal homotetramérico formado solamente por subunidades *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449C, la cinética de inactivación de tipo C es descrita por la suma de dos exponenciales con τ_1 de 600 ± 96 ms y τ_2 de 8900 ± 2700 ms ($n=7$). En el caso de los canales formados por los dímeros, la constante de tiempo fue ajustada por una sola exponencial con un τ de 3300 ms para el dímero T449C-WT y 4400 ms para el dímero WT-T449C (datos no mostrados). De este modo la cinética de los dímeros no parece ser modificada por el orden en el cual están las subunidades. En este caso los canales formados por más de un tipo de subunidad presentan una cinética similar a la del canal homotetramérico formado por una de ellas, el canal WT. Este punto se retomará en la discusión.

3. Interacción de aminoácidos en el proceso de inactivación de tipo C.

La mutación del ácido glutámico 447 por ácido aspártico (D447E) resulta en un canal con una cinética de inactivación tipo C tan rápida como la inactivación de tipo N (Seoh y Papazian, 1995) con un $\tau_i < 10$ ms (Fig. 21A). Por otra parte, el tipo de aminoácido en la posición 449 de la proteína *Shaker* puede alterar en forma dramática la cinética de inactivación de tipo C (Lopez-Barneo y col., 1993) obteniéndose canales con una cinética muy rápida ($\tau_i \approx 100$ ms) hasta canales que se inactivan muy lentamente ($\tau_i \approx 12000$ ms). Los tres mutantes 449 más lentos descritos en la literatura son *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449H, T449V y T449Y con constantes de tiempo de 6400 ms, 10000 ms (López-Barneo y col., 1993) y de 13000 ms (esta tesis Fig. 18B) respectivamente. Observando el comportamiento cinético de dobles mutantes se intentó revertir el efecto de la mutación en la posición 447 sobre la inactivación efectuando una segunda mutación, en la posición 449.

El doble mutante *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447E T449Y mostró una cinética de inactivación de tipo C similar a la del canal silvestre, con un $\tau_i = 4440 \pm 1300$ ms ($n=7$). En este caso la segunda mutación logró revertir el efecto de la primera (Fig 21C). En el caso del doble mutante *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447E T449V la reversión del efecto de la primera mutación fue sólo parcial lográndose una cinética de inactivación con $\tau_i = 593 \pm 130$ ms ($n=13$) (Fig 22). Por último, en el caso de la doble mutante *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447E T449H los canales se comportaron como el mutante simple en posición 447 con un $\tau_i < 10$ ms ($n= 20$) (Fig. 22). Se observó que los efectos de las

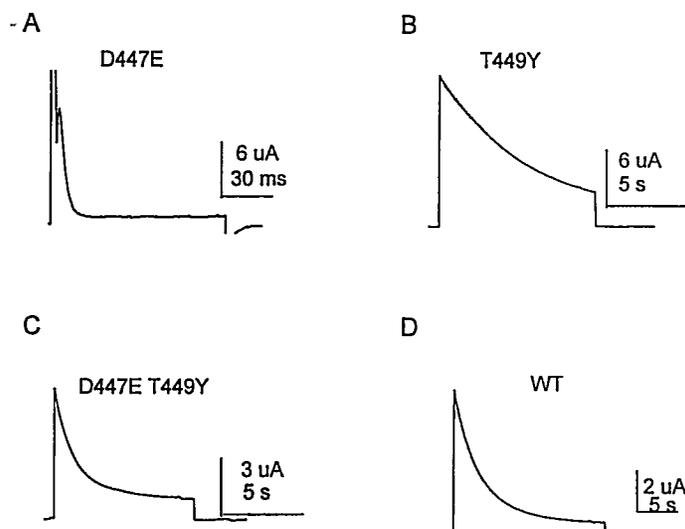


Figura 21. Efecto de la mutación T449Y sobre la cinética de inactivación de la mutante D447E.

Las cinéticas de inactivación obtenidas en respuesta a un pulso despolarizante a 0 mV desde un $V_p = -90$ mV, fueron ajustadas con una función exponencial. (A) Cinética de inactivación de D447E, $\tau_i < 10$ ms. (B) Cinética de inactivación de T449Y, $\tau_i = 13011 \pm 3400$ ms. (C) Cinética de inactivación del doble mutante D447E T449Y, $\tau_i = 4440 \pm 1300$ ms. (D) Cinética de inactivación del canal WT, $\tau_i = 4000 \pm 360$ ms.

mutaciones en las posiciones 449 y 447 no son aditivos, es decir no se anula el efecto una mutación que acelera la inactivación con otra que la enlentece. El efecto de las dobles mutaciones en la cinética de inactivación nos indica que existiría una interacción entre los residuos 449 y 447, o que sus efectos están acoplados.

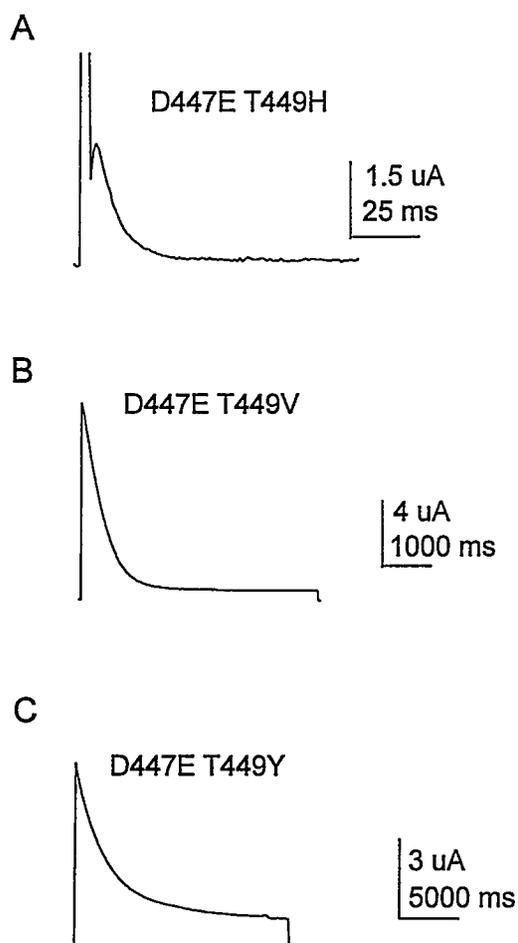


Figura 22. Cinética de inactivación de los dobles mutantes en posición 447 y 449. Las cinéticas de inactivación obtenidas en respuesta a un pulso despolarizante a 0 mV desde un $H_p = -90$ mV, fueron ajustadas con una función exponencial. (A). Cinética del canal D447E T449H: $\tau_i < 10$ ms. (B). Cinética del canal D447E T449V: $\tau_i = 593 \pm 130$ ms. (C). Cinética del canal D447E T449Y: $\tau_i = 4440 \pm 1300$ ms.

4. *Accesibilidad del poro en el estado inactivado tipo C.*

Yellen y col. (1994) demostraron que el canal mutante T449C en estado inactivado tipo C une cadmio con una afinidad mucho mayor que el canal en el estado abierto. Esto puede ser interpretado de dos maneras: el estado inactivado presenta una constricción de la boca externa del canal lo que permite una mejor coordinación del cadmio o bien que al inactivarse el canal los residuos cisteína se exponen facilitando de este modo la unión. Se intentó esclarecer, si esta constricción existe y a que nivel ocurre caracterizando el bloqueo por Ba^{2+} del estado inactivado tipo C. La accesibilidad al poro del canal ShakerH4 $\Delta 6-46$ en el estado inactivado tipo C fue estudiada usando como sonda el ion Ba^{2+} . Este ion divalente es capaz de bloquear el estado cerrado y el estado abierto cuando es aplicado externamente (Armstrong y col. 1982, Hurst y col, 1995) y además el Ba^{2+} presenta un radio similar al del ion K^+ (1,35 y 1,33 Å, respectivamente).

4.1. *Existencia del estado inactivado tipo C bloqueado por Ba^{2+} .*

En una primera etapa se verificó si el Ba^{2+} es capaz de bloquear el estado inactivado tipo C exponiendo canales inactivados a una solución con el ion divalente. Para esto se despolarizó la membrana citoplasmática a 0 mV por 2 min, período en el cual el proceso de inactivación alcanza el equilibrio (ver figura 14), y luego manteniendo la membrana a 0 mV se expuso el oocito por 5 min a una solución con Ba^{2+} (Fig. 23A). Durante este período el bario se une a los canales en estado abierto (a

la fracción que no se inactiva) y, posiblemente a los en estado inactivado tipo C. El bloqueador fue lavado de la cámara, manteniendo el potencial de membrana a 0 mV por 5 minutos más, tiempo suficiente para que el Ba^{2+} salga de los canales abiertos (ver sección 4.3 más adelante). La membrana se repolarizó a -100 mV y la fracción de canales bloqueados se cuantificó con pulsos despolarizantes de 15 ms a 0 mV, repetidos cada 5 s. En presencia del Ba^{2+} la corriente medida en el primer pulso luego de la repolarización corresponde al 42% de la corriente control (corriente medida en ausencia de Ba^{2+}) (Fig. 23B).

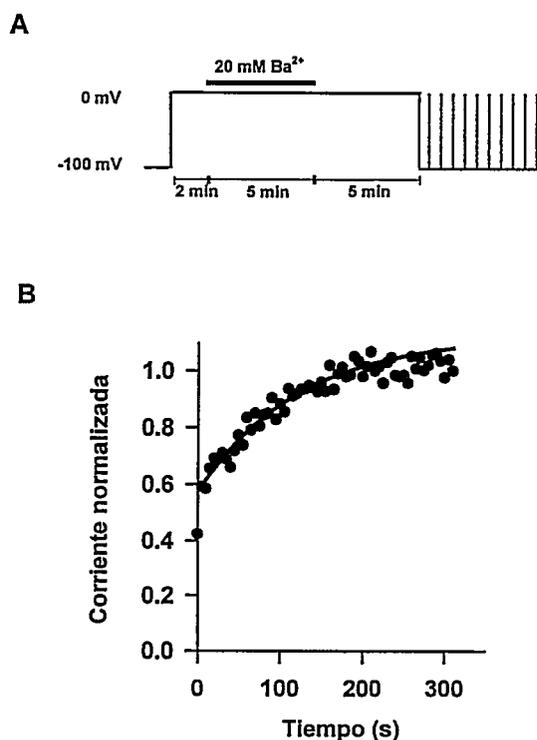


Figura 23. El bario puede unirse al estado inactivado tipo C.

(A). Los canales se mantienen a 0 mV por 2 min. Se aplica Ba^{2+} externo 20 mM por 5 min, y luego se remueve. El potencial se mantiene 5 min más a 0 mV. La corriente fue medida, desde un potencial de mantención de -100 mV, con pulsos de 15 ms a 0 mV, cada 5 s. (B). Los símbolos muestran la corriente al final de cada pulsos de prueba. La fracción de corriente residual luego de 5 min de lavado fue de 0,59 de la extrapolación a $t = 0$ de una exponencial simple, con un $\tau = 122$ s.

Este resultado indica que una fracción importante de los canales no han liberado el bario durante los 5 minutos de lavado. En ausencia de Ba^{2+} los canales se recuperan de la inactivación durante los primeros 5 segundos que siguen a la repolarización (ver figura 15) en tanto que en presencia de Ba^{2+} en 5 s sólo un 30 % de la corriente bloqueada se recupera rápidamente, llegando a un 60 % de la corriente control. El resto de los canales se recuperan lentamente, en un proceso monoexponencial con un τ de 122 s. La similitud de esta cinética de disociación con la de la salida desde el sitio estable de unión de Ba^{2+} descrito en el canal cerrado (Hurst y col., 1995; ver anexo 1), sugiere que el ion bario después del período de unión a 0 mV (al estado inactivado) y luego de haber repolarizado la membrana, se libera desde este sitio descrito por Hurst y col. (1995).

Con el fin de comprobar este punto se compararon las rapidezces de salida del Ba^{2+} con pulsos de prueba a 0 mV, dados a diferentes intervalos, en canales en los cuales el Ba^{2+} se unió en el estado cerrado o canales en los cuales el Ba^{2+} se unió en el estado inactivado de tipo C. La figura 24 muestra que a medida que se disminuye el intervalo entre los pulsos de prueba, la salida del Ba^{2+} se hace más rápida (disminuye τ) tanto para el Ba^{2+} que se unió a canales cerrados como para el Ba^{2+} que se unió a canales inactivados tipo C, siendo además las constantes de tiempo a un intervalo dado, similares entre ellas. Estos resultados sugieren que el Ba^{2+} sale desde el mismo sitio en el canal de acuerdo a las reacciones *i* para canales cerrados e *ii* para canales inactivados:

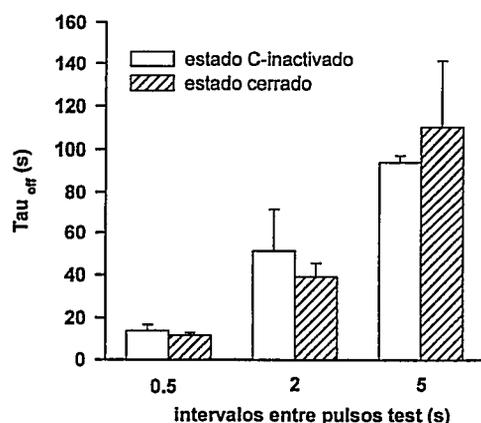
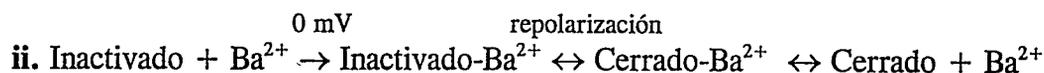
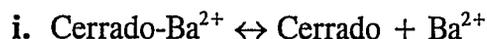


Figura 24. El Ba²⁺ sale desde el mismo sitio, sin importar si entró al canal en estado inactivado tipo C o en estado cerrado.

El Ba²⁺ fue cargado en el estado inactivado tipo C a 0 mV por 5 min. Luego el Ba²⁺ fue removido manteniendo la membrana a 0 mV por otros 5 min. Finalmente la membrana fue repolarizada a -100 mV, y la salida de Ba²⁺ fue monitoreada con pulsos de prueba cada 0,5, 2 o 5 s. Los datos fueron ajustados a una exponencial simple con una constante de tiempo de $3,8 \pm 2,8$ s, $51,3 \pm 21$ s y $94,0 \pm 3$ s, respectivamente ($n = 4$). En los canales cerrados el Ba²⁺ fue cargado

por 5 min a -100 mV y la salida monitoreada a las mismas frecuencias. Las constantes de tiempo obtenidas fueron $11,6 \pm 1,1$ s, $39,3 \pm 6$ s y 110 ± 31 s ($n = 4$).

4.2. Velocidad de formación y disociación del complejo inactivado tipo C -Ba²⁺.

4.2.1. Cinética de disociación del complejo.

Para determinar la cinética de salida del Ba²⁺ desde el canal se siguió el protocolo descrito en la sección 4.1, con 5 min de exposición al bloqueador y variando el tiempo de lavado (t_{lavado}) entre 1 a 15 min (Fig 25A). El resultado nos muestra que la corriente normalizada, medida inmediatamente después de la despolarización, es prácticamente la misma para cualquier t_{lavado} (Fig. 25B). Por lo tanto la unión del

bario a los canales inactivados tipo C puede considerarse irreversible dentro de los intervalos de tiempo usados.

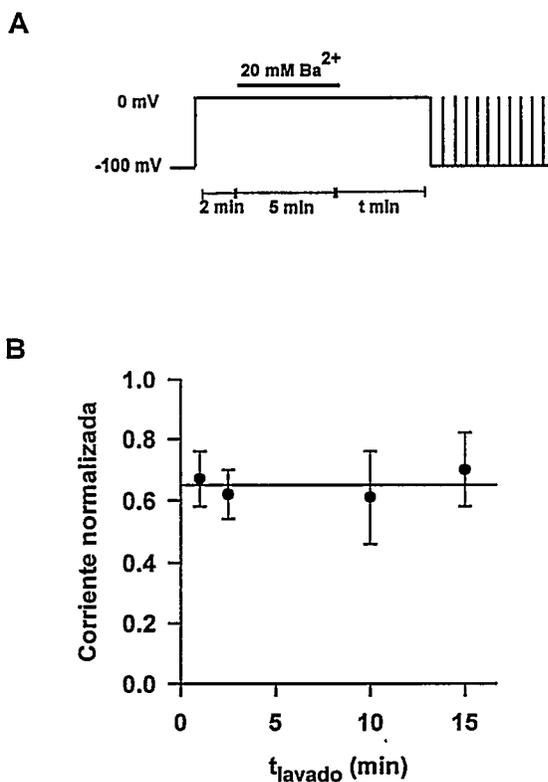


Figura 25. Velocidad de disociación del complejo inactivado tipo C- Ba^{2+} .

(A). Los canales fueron inactivados por 2 min a 0 mV y se agregó Ba^{2+} 20 mM externamente. Luego de 5 min a 0 mV, el Ba^{2+} fue lavado y se mantuvo la membrana a 0 mV por distintos períodos de tiempo. La membrana fue repolarizada a -100 mV, y se repitieron pulsos de prueba de 15 ms a 0 mV, cada 5 s. (B). Se muestra la fracción de canales no bloqueados, luego de repolarizar, a diferentes tiempos de lavado ($n=4$).

4.2.2. Cinética de formación del complejo Ba^{2+} -inactivado tipo C.

La velocidad de unión de Ba^{2+} al estado inactivado tipo C fue medida con un protocolo similar al de la figura 23, pero variando el tiempo de exposición al Ba^{2+} entre 2 a 45 min (Fig. 26A). La fracción de canales bloqueados se midió después de un período de 5 min en ausencia de Ba^{2+} , tiempo que fue escogido porque permite un lavado completo del compartimento extracelular, que es especialmente difícil cuando

se trabaja a altas concentraciones de Ba^{2+} (70 mM). En la figura 26B se puede observar la cinética de bloqueo por Ba^{2+} , que puede ser descrita por una exponencial con un pedestal (ec. 1). Este pedestal fue un resultado inesperado, puesto que la reacción de salida del bario es irreversible y por lo tanto el bloqueo debería haber llegado a ser completo. Los resultados indican, que a pesar que el tiempo característico de la cinética de entrada (τ_{on}) es más corto a medida que la concentración de Ba^{2+} crece, el valor del pedestal (C) es constante ($\sim 0,4$) (Fig. 26C). Esto ocurre aún cuando el Ba^{2+} en la solución externa es 70 mM y la corriente residual se mide a tiempos largos (45 min), obteniéndose un valor para C de 0,36. Cabe recordar que la corriente normalizada mostrada en la figura 23 es medida después de repolarizar la membrana a -100 mV, puesto que para determinar la fracción de canales no bloqueados durante el estado inactivado tipo C estamos obligados a cerrar los canales.

El bloqueo de canales cerrados por Ba^{2+} externo fue caracterizado en detalle por Hurst y col. (1995) y discutido en el anexo 1. Este bloqueo comprende una fase rápida, casi instantánea, seguida de una fase lenta con decaimiento exponencial. Como se menciona en la anexo 1, tanto la formación como la disociación del complejo "lábil" cerrado- Ba^{2+} es rápida. Si el bario no se lava este complejo puede transformarse lentamente en un complejo estable que se disocia con una constante de tiempo de minutos. En otras palabras, la interacción del Ba^{2+} con el canal cerrado puede ser explicada en términos de dos sitios secuenciales (ver anexo I, esquema R-5). Debemos explicar la existencia de una fracción de corriente que no se bloquea considerando que el bloqueo del canal

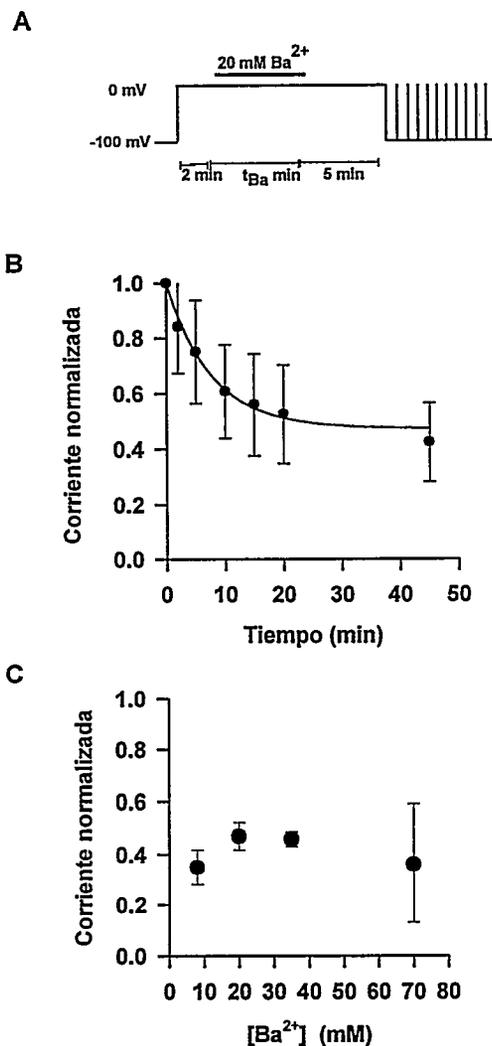


Figura 26. Velocidad de formación del complejo inactivado tipo C- Ba^{2+} .

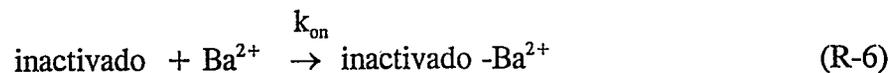
(A). Los canales fueron inactivados por 2 min, para luego agregarse Ba^{2+} 20 mM por períodos entre 2 a 45 min. Luego de lavar el Ba^{2+} y mantener por otro 5 min la membrana a 0 mV, se repolarizó a

-100 mV, dando pulsos de prueba de 15 ms a 0 mV, cada 5 s. (B). Fracción no bloqueada, $I(0)/I(\text{control})$, como función del tiempo de exposición a Ba^{2+} . La cinética se ajustó a una exponencial con una constante de tiempo $\tau_{on} = 7,65 \pm 2,0$ min y un pedestal $C = 0,47 \pm 0,05$ ($n = 3$). (C). El pedestal C es independiente de la concentración de Ba^{2+} . La cinética de entrada a tres concentraciones Ba^{2+} (8, 20 y 35 mM) fueron determinadas y ajustadas con una exponencial simple con un pie, de modo de conocer el pedestal. Se obtuvo valores de $0,35 \pm 0,06$, $0,47 \pm 0,05$ y $0,46 \pm 0,03$ para $[Ba^{2+}] = 8, 20$ y 35 mM, respectivamente ($n = 3$ o 4). Para $[Ba^{2+}] = 70$ mM se midió la fracción no bloqueada a $t_{Ba} = 45$ min, y corresponde a $0,36 \pm 0,23$ ($n = 3$).

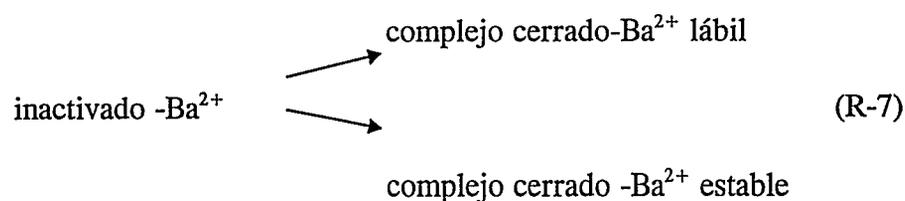
inactivado tipo C puede ser modelado en términos de un sitio único (ver sección 4.4).

Para esto consideramos que luego de la repolarización, el complejo inactivado- Ba^{2+} puede transformarse en complejo cerrado- Ba^{2+} estable o cerrado- Ba^{2+} lábil, de acuerdo al siguiente esquema:

i.- entrada a 0 mV:



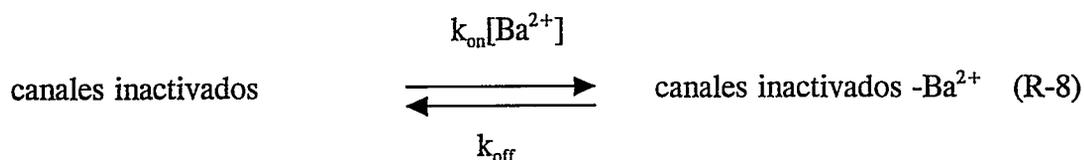
ii.- salida a -100 mV



Después de la repolarización todos los canales que pasaron al estado cerrado-Ba²⁺ lábil liberan el bloqueador instantáneamente dando origen a la fracción de corriente que no se observa bloqueada, C, aún a tiempos muy largos de exposición. Puesto que el estado inactivado-Ba²⁺ es muy estable esperamos que a tiempos muy largos ($t \gg \tau$), la corriente bloqueada alcance siempre el mismo valor, ya que la fracción de canales que llega al estado cerrado-Ba²⁺ lábil es independiente de la concentración de Ba²⁺ externa.

4.2.3. La unión de Ba^{2+} al canal inactivado tipo C es una reacción bimolecular.

Un modelo simple para la acción del Ba^{2+} sobre los canales inactivados tipo C se muestra a continuación



Este modelo predice que el decaimiento de la corriente en presencia de Ba^{2+} externo es descrita por una exponencial simple con una constante de tiempo τ

$$\tau = 1 / (k_{\text{on}}[Ba^{2+}] + k_{\text{off}}) \quad (\text{ec. 9})$$

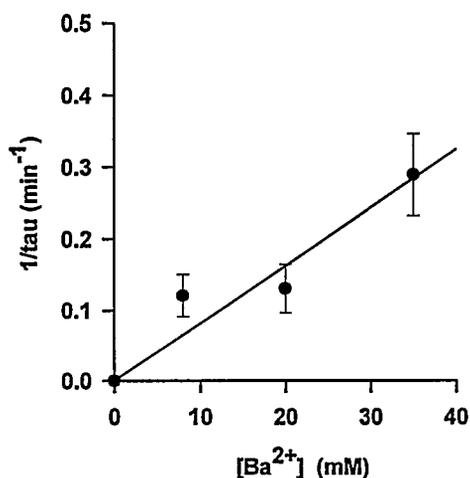


Figura 27. Dependencia de la concentración de Ba^{2+} de $1/\tau$.

La constante de tiempo τ_{on} fue estimada del ajuste a una función exponencial de las cinéticas de entrada, (4 oocitos para cada concentración). Los datos de $1/\tau$ v/s $[Ba^{2+}]$ fueron ajustados a una línea recta (ec. 9) donde $k_{\text{off}} = 0$ y la pendiente corresponde a la constante de asociación de segundo orden, k_{on} , con un valor de $0,14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Puesto que el complejo inactivado- Ba^{2+} es muy estable, $\tau \approx 1/k_{on}[Ba^{2+}]$, y por lo tanto la velocidad de bloqueo es una función lineal de la concentración de Ba^{2+} . Esta predicción se corroboró experimentalmente (Fig. 27): el recíproco de τ es directamente proporcional a la concentración de Ba^{2+} .

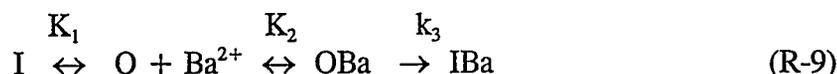
Esto sugiere que el canal en estado inactivado puede unir bario directamente, aunque en un proceso muy lento. La constante cinética para la reacción bimolecular descrita en el esquema, bajo las condiciones experimentales mostradas en la figura 26, es $k_{on} = 0,14 M^{-1}s^{-1}$.

4.3. Bloqueo del estado abierto por Ba^{2+} extracelular.

El análisis hecho hasta ahora tiene como supuesto que la unión y la disociación del Ba^{2+} al canal abierto es rápida. Se caracterizó el bloqueo del estado abierto tomando ventaja de que la inactivación de tipo C es incompleta, y siempre hay una fracción de canales abiertos ($\approx 12\%$). Se agregó externamente el bloqueador luego de alcanzar el equilibrio de la inactivación de tipo C, y se caracterizó el decaimiento de la corriente de estado estacionario. Aunque la unión de bario al estado abierto es rápida, y aún a bajas concentraciones de Ba^{2+} demora menos de 2-3 s, la corriente residual fue medida 75 s después de la aplicación del Ba^{2+} para asegurarse de haber alcanzado el nuevo estado estacionario. Con el fin de conocer la constante de disociación aparente al estado abierto se estudió la inhibición de la corriente a varias concentraciones de Ba^{2+} . Los datos de inhibición en función de la concentración de

Ba^{2+} se ajustaron a la ecuación de Hill (ec. 7) con $K_d(0) = 0,098 \pm 0,004 \text{ mM}^N$ y un coeficiente de Hill, $N = 0,57 \pm 0,03$ (Fig. 28A). Además, el estudio de la dependencia del voltaje de la unión del bario al estado abierto demostró que, en el rango de potencial usados, la unión es independiente del potencial (Fig. 28B).

Si los canales que entran al estado C-inactivado, no pudieran unir el Ba^{2+} directamente, la reacción de unión debiera seguir el siguiente esquema cinético



El proceso de unión y disociación del Ba^{2+} al estado abierto es mucho más rápido que al estado inactivado de tipo C. Por lo tanto las reacciones I-O y O-OBa están en equilibrio respecto a la formación del complejo IBa, y por lo tanto τ_{on} para es

$$1/\tau_{on} = k_3 P_{OBa} = k_3 ([Ba^{2+}] / ([Ba^{2+}] + K_2 + K_1 K_2)) \quad (ec. 10)$$

donde P_{OBa} es la probabilidad de encontrar el canal en el estado OBa.

La ecuación 10 predice que $1/\tau_{on}$ debería saturarse a altas concentraciones de Ba^{2+} , alcanzando como valor máximo k_3 . A las concentraciones de Ba^{2+} usadas ($[Ba^{2+}] \geq 8 \text{ mM}$), y dadas las características de la unión al estado abierto, la fracción de canales abiertos bloqueados por Ba^{2+} , $P_{OBa} \approx 1$. Si el estado IBa se alcanzara pasando a través

del estado OBa, $1/\tau_{on}$ en la figura 27 debiera ser independiente de la concentración de la concentración de Ba^{2+} .

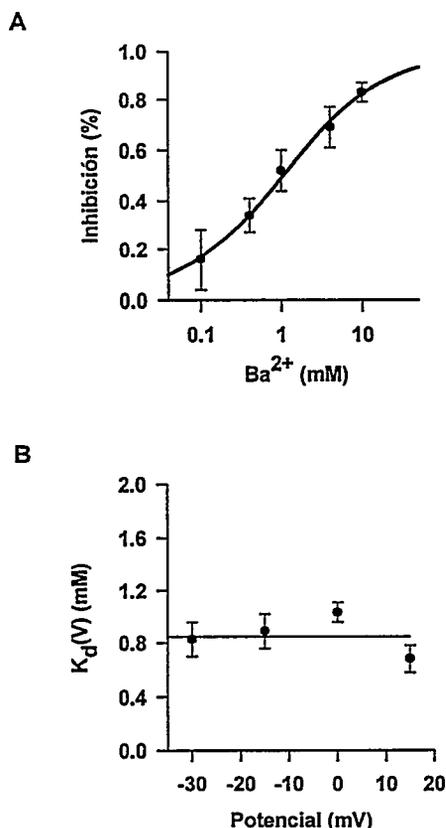


Figura 28. Bloqueo por Ba^{2+} externo del estado abierto del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$.

(A). Curva de inhibición de los canales abiertos. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill (ec. 7) y los parámetros obtenidos fueron $K_d(0) = 0,098 \pm 0,004 \text{ mM}^N$ y un coeficiente de Hill, $N = 0,57 \pm 0,03$ ($n=4$).

(B). El bloqueo de los estados abiertos es independiente del potencial. Se muestra la constante de disociación aparente en función del potencial (-30, -35, 0 y 15 mV). La línea muestra la K_d promedio y corresponde a 0,85.

4.4. Dependencia del potencial y de la concentración de Ba^{2+} del bloqueo del estado inactivado tipo C.

Para determinar la cinética de formación del complejo inactivado tipo C- Ba^{2+} en función del potencial y de la concentración de bario se usó el protocolo de la figura 26. El tiempo de exposición a Ba^{2+} externo fue de 15 min, el intervalo de concentraciones de Ba^{2+} varió entre 8 y 70 mM y los potenciales despolarizantes (V_{depol}) para inducir

la inactivación de tipo C fueron -20, 0 o 30 mV. Al comparar la fracción de corriente no bloqueada con una concentración de bario y distintos potenciales despolarizante no se observan diferencias (Fig. 29). Si la entrada del Ba^{2+} al estado inactivado fuese dependiente del potencial, esperaríamos que mientras más negativo es el potencial menor es la fracción de corriente sin bloquear con 15 minutos de exposición. Podemos concluir que no hay efecto del potencial en la velocidad de formación del complejo, al estudiarlo para cada concentración de Ba^{2+} , ya que a un mismo tiempo (15 min) tenemos el mismo nivel de bloqueo.

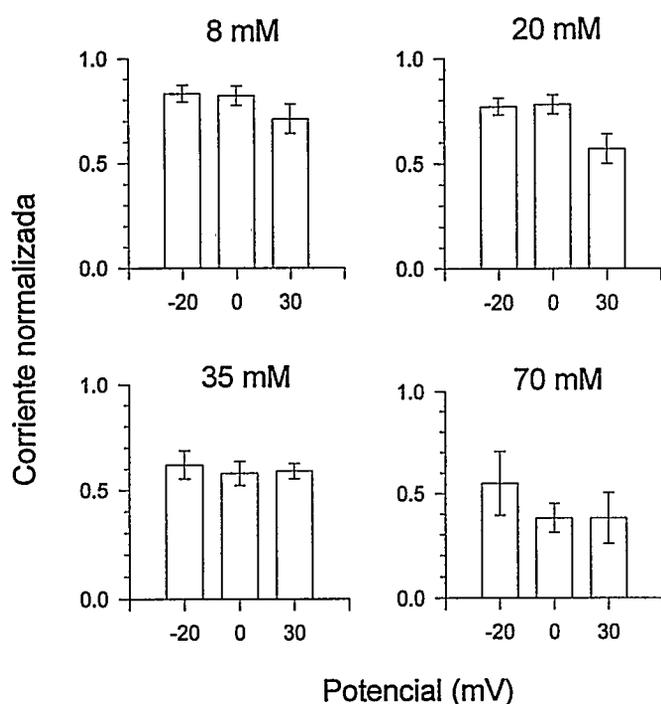


Figura 29. La asociación del Ba^{2+} al estado inactivado tipo C es independiente del potencial.

La fracción de corriente no bloqueada fue medida a $V_{depol} = -20, 0$ o 30 mV para cuatro concentraciones de Ba^{2+} . El tiempo de incubación con Ba^{2+} fue de 15 min. Se observa que la fracción de corriente no bloqueada disminuye a medida que se aumenta la concentración de Ba^{2+} . Esto se debe a que las mediciones se efectuaron todas con un mismo tiempo de exposición a Ba^{2+} , y la rapidez de entrada depende de la concentración.

En resumen el canal en el estado inactivado tipo C es accesible a Ba^{2+} externo, uniéndose un ion por canal y formando de un complejo muy estable.

5. *Efecto del Ba^{2+} externo sobre la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta.*

Olcese y col. (1997) mostraron que existe una correlación entre el corrimiento en el eje del potencial de la curva de cargas de compuerta ($Q(V)$) y el establecimiento de la inactivación tipo C, lo que refleja el establecimiento de una nueva conformación del sensor de potencial (ver introducción sección 3.2.4). Por otra parte, el estudio del bloqueo de los canales inactivados tipo C por Ba^{2+} externo midiendo las corrientes macroscópicas, reveló la formación de un complejo muy estable. El resultado de estos experimentos nos hacen pensar que el bario unido al canal podría estar estabilizando el sensor de potencial en la conformación que este adquiere cuando el canal está en estado inactivado tipo C.

El estudio de las corrientes de compuerta requiere la ausencia de corriente iónica, para evitar que esta última la enmascare. Existen mutantes puntuales en la región del poro del canal que no conducen iones y no presentan diferencias en las corrientes de compuerta al ser comparadas con el canal silvestre. Estos mutantes han hecho posible un estudio detallado del movimiento del sensor de voltaje en el canal de K^+ *Shaker* (Perozo y col., 1993). También es posible medir estas corrientes de compuerta en canales que normalmente conducen iones. Para esto es necesario sacar el potasio interno y el externo, de modo que no esté presente el ion conductor, y reemplazarlo por un ion que no pase a través del canal. Con el fin de estudiar el movimiento de las cargas de compuerta de los canales inactivados tipo C bloqueados

con Ba^{2+} y compararla con el movimiento de las cargas de compuerta en los canales cerrados se usaron los siguientes protocolos:

i. Canales cerrados: se partió con los canales cerrados ($H_p = -90$ mV) y se dieron pulsos despolarizantes a diferentes potenciales. En respuesta a estos pulsos el sensor de potencial se mueve en el campo eléctrico, pasando a una posición que permitiría la conducción iónica, lo que se ve reflejado en las “corrientes compuerta on”. Al terminar el pulso y volver al potencial de mantención, el sensor de potencial vuelve a retomar su posición inicial generando una “corriente de compuerta off”.

ii. Canales inactivados tipo C: el potencial de mantención ($H_p = 0$ mV) asegura que los canales están en el estado inactivados tipo C al inicio del protocolo. Luego se dieron pulsos hiperpolarizantes a diferentes potenciales, de modo que los canales pasan al estado cerrado. El sensor de potencial que estaba en estado inactivado tipo C se mueve en el campo eléctrico pasando a la posición del canal cerrado (“corriente de compuerta on”). Al finalizar el pulso, el sensor de potencial vuelve a retomar su posición inicial, en este caso la del estado inactivado tipo C, generando la “corriente de compuerta off” (compare las figuras 30 y 31).

5.1. Efecto del Ba^{2+} sobre el movimiento de cargas de compuerta en el canal

ShakerH4 $\Delta 6-46$ W434F.

El mutante *ShakerH4 $\Delta 6-46$ W434F*, es un canal no conductor empleado para el estudio de las corrientes de compuerta. Al comparar el movimiento de las cargas de compuerta de canales cuando el potencial de mantención fue de -90 mV en 2 mM Ca^{2+}

o 2 mM Ba^{2+} , se observa que no hay mayores diferencias en las corrientes de compuerta on. En el caso de la corriente de compuerta off hay un efecto del Ba^{2+} externo, no observándose la aparición de un componente lento en la corriente de compuerta de off a potenciales > -45 mV como ocurre en el caso del Ca^{2+} (Fig. 30). Este cambio fue descrito por Hurst y col. (1996). Al comparar las corrientes de compuerta de los canales inactivados tipo C, en

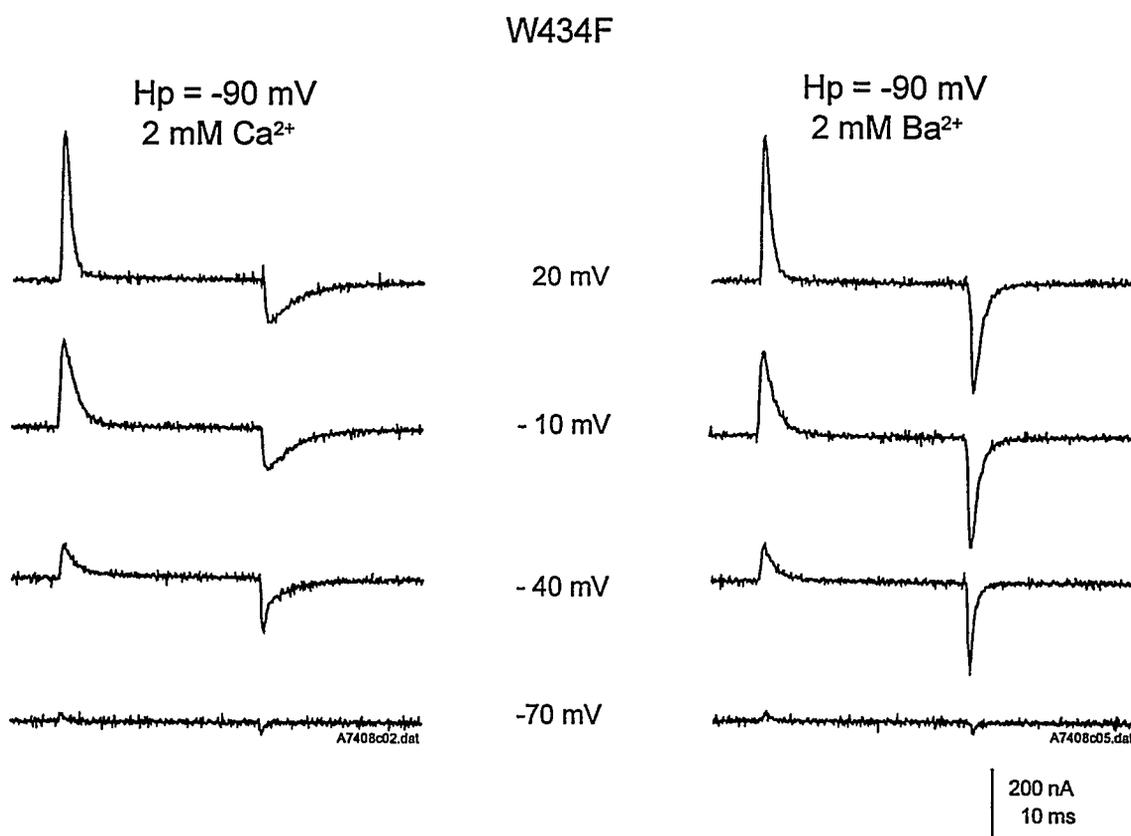


Figura 30. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F en 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, con potencial de mantenimiento de -90 mV.

A partir de un Hp = -90 mV (canales cerrados) se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados, registrándose la corriente de compuerta.

presencia de 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, se comprobó que a un mismo potencial la carga movilizada en presencia de Ca^{2+} externo es mayor que la movilizada en presencia de Ba^{2+} externo (Fig. 31). No se observan cambios notables en las cinéticas de las corrientes de compuerta, al comparar niveles equivalentes de carga movilizada en Ca^{2+} y Ba^{2+} .

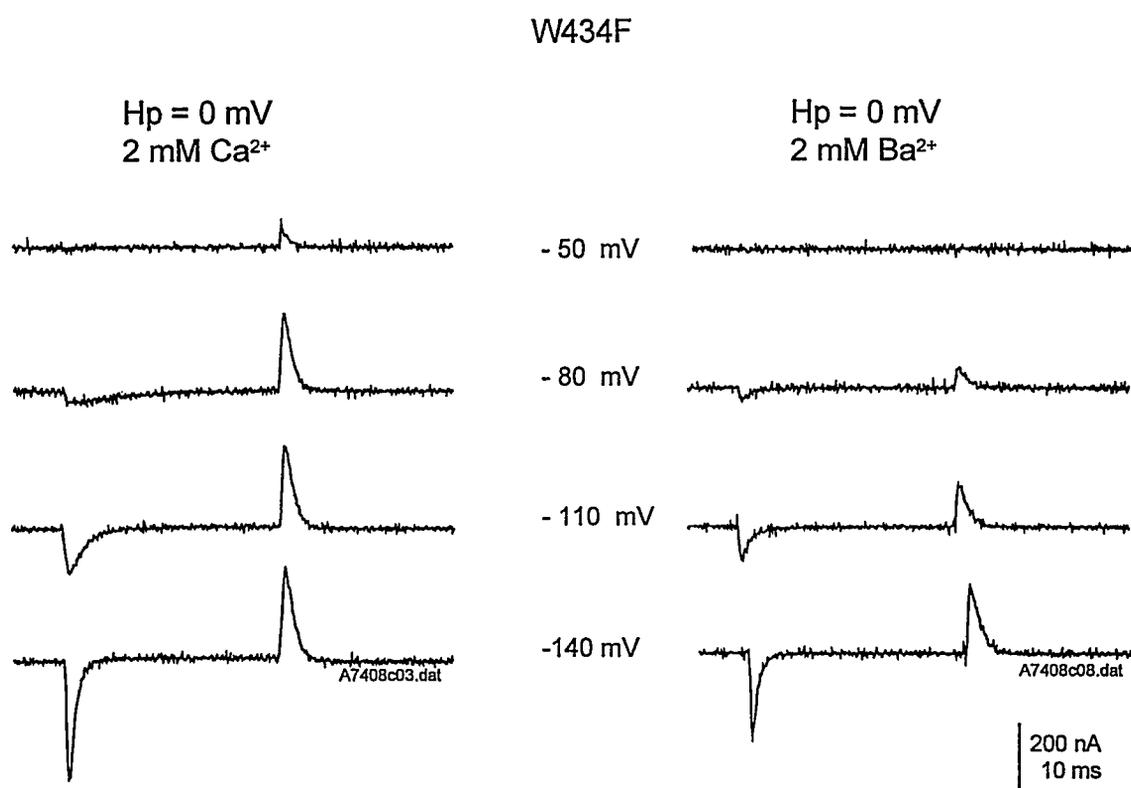


Figura 31. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F en 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, con potencial de mantención de 0 mV. A partir de un Hp = 0 mV (canales inactivados) se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados y se registraron las corrientes de compuerta.

La cantidad de carga movilizada se cuantificó en cada pulso de potencial, integrando la corriente en función del tiempo. Con el fin de determinar el potencial medio ($V_{1/2}$) y poder comparar la posición de las curvas en el eje del potencial los datos se ajustaron con la suma de dos funciones de Boltzmann (ec. 8), como fue descrito por Olcese y col. (1997). Los resultados se muestran en la figura 32, siendo evidente que el Ba^{2+} induce un corrimiento de la curva $Q(V)$ hacia potenciales hiperpolarizantes en los canales en estado inactivado tipo C. El Ba^{2+} no afecta la posición de la curva $Q(V)$, cuando la carga se desplaza entre los estados cerrados ($H_p = -90$ mV).

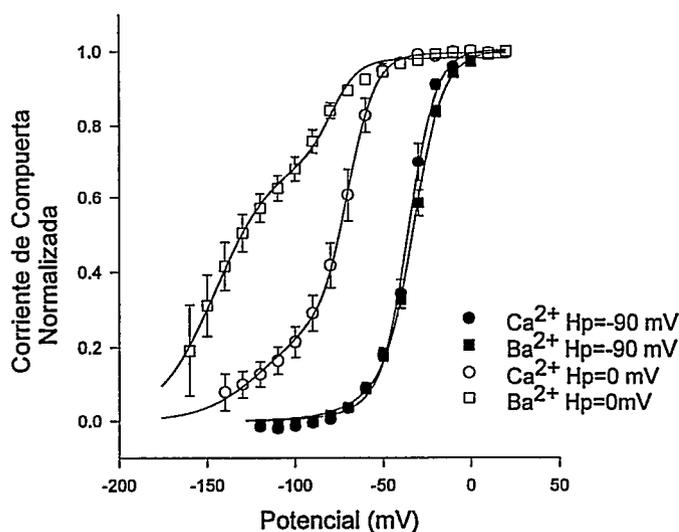


Figura 32. Curva de carga de compuerta normalizada en función del potencial en el canal *ShakerH4 Δ W434F*.

Curvas obtenidas con un $H_p = -90$ mV en Ca^{2+} (●) o Ba^{2+} (■), en el cual los canales están cerrados, o un $H_p = 0$ mV en Ca^{2+} (○) o en Ba^{2+} (□), en el cual los canales están inactivados. En todos los casos los pulsos fueron de 25 ms, y se integró la corriente on ($n=3$). Sólo cuando los canales parten del estado inactivado tipo C el Ba^{2+} tiene un efecto sobre la posición de la curva respecto a Ca^{2+} . La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación 8 y los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 1.

Además se observa que la curva $Q(V)$ de los canales inactivados tipo C está corrida a la izquierda respecto a la curva de los canales cerrados en 2 mM Ca^{2+} , como fue descrito por Olcese y col. (1997). Los valores obtenidos de los ajustes se resumen en la tabla I.

5.2. Efecto del Ba^{2+} sobre el movimiento de cargas de compuerta en el canal

ShakerH4 $\Delta 6-46$.

Con el fin de comprobar que el efecto de Ba^{2+} descrito anteriormente no es un caso particular del mutante W434F se hicieron los experimentos en el canal silvestre, para lo cual se debió lavar le potasio interno y utilizar una solución extracelular sin potasio. Se verificó al finalizar el experimento, con una solución extracelular con potasio, que los canales eran capaces de conducir y tenían cinéticas normales. En el caso de los canales cerrados se observó que no hay efecto de Ba^{2+} sobre la cantidad de carga movilizada, pero si sobre la cinética de la corriente de compuerta off (Fig. 33). En el caso de los canales inactivados tipo C el Ba^{2+} afecta la cantidad de carga que se moviliza si se compara con Ca^{2+} a un mismo potencial (Fig. 34). Para movilizar la misma cantidad de carga es necesario aplicar un potencial más hiperpolarizante cuando los canales están en presencia de Ba^{2+} que cuando están en Ca^{2+} .

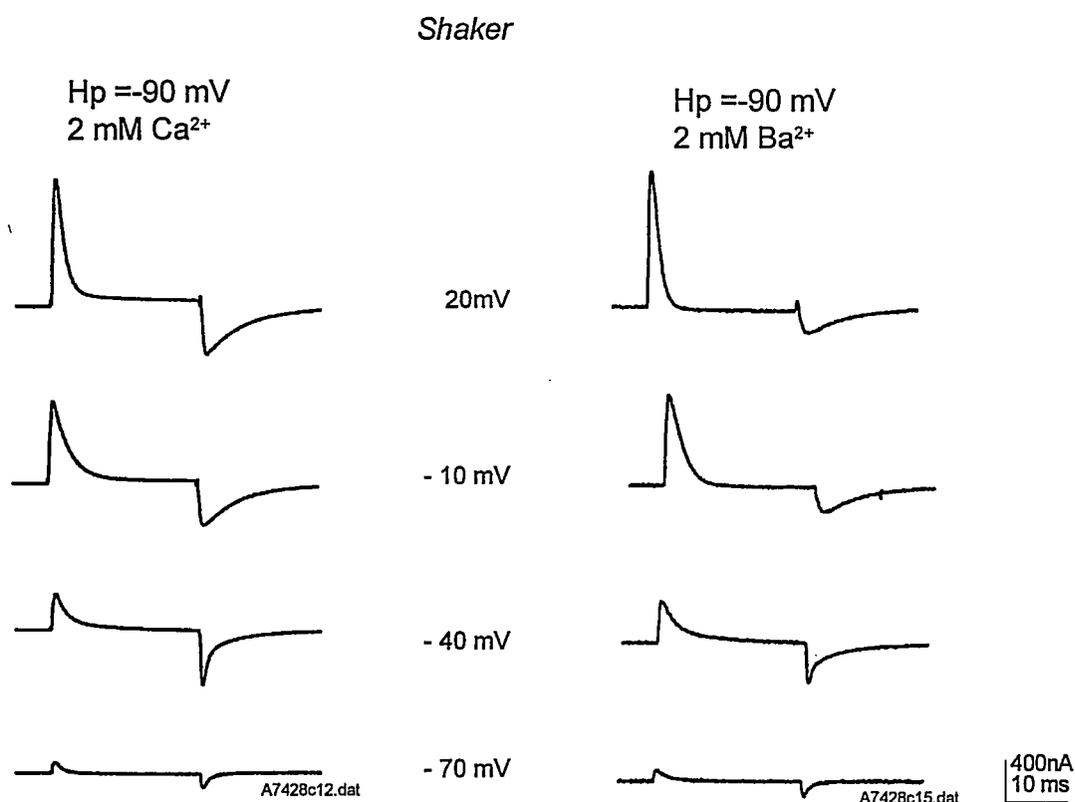


Figura 33. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ en 2 mM Ca²⁺ o 2 mM Ba²⁺ externo, con potencial de mantención de -90 mV.

Se vació el oocito de potasio interno y se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados a partir de un Hp = -90 mV (canales cerrados) para registrar las corrientes de compuerta.

Al ajustar los datos a la suma de dos funciones de Boltzmann (ec. 8) se pudo comprobar que el Ba²⁺ modifica la posición de la curva Q(V), en ≈ 20 mV, cuando los canales están en el estado inactivado tipo C (Fig. 35). El corrimiento de la curva Q(V) de los canales inactivados tipo C en la solución con Ca²⁺ respecto a la curva de los canales cerrados es mayor que el observado en el mutante W434F. Puesto que la posición de la curva de canales inactivados en Ba²⁺ es similar para el canal silvestre y el

canal W434F, la diferencia entre Ba^{2+} y Ca^{2+} de las curvas de los canales inactivados es menor en el canal silvestre que para W434F (ver tabla I).

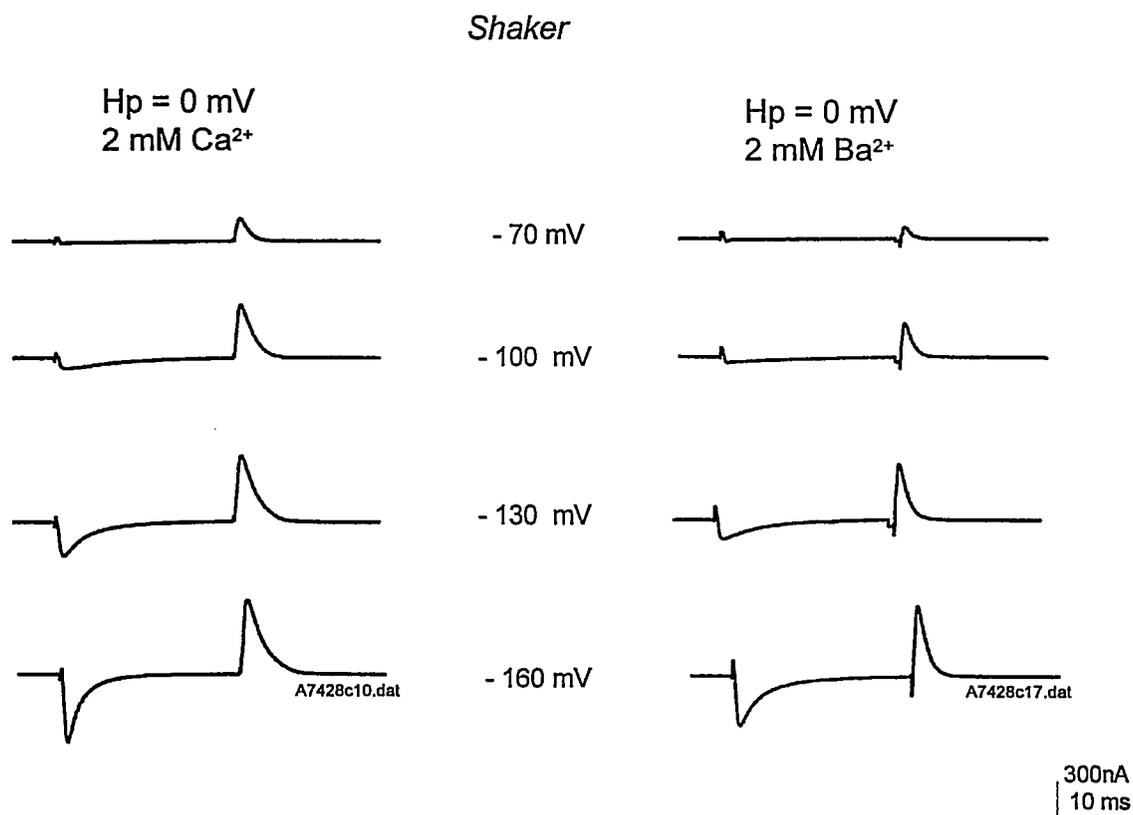


Figure 34. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ en 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, con un potencial de mantenci3n de 0 mV.

Se vaci3 el oocito de potasio interno y se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados a partir de un Hp = 0 mV (canales inactivados) para registrar las corrientes de compuerta.

En el caso de los canales cerrados el Ba^{2+} no tiene ning3n efecto en la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta. De este modo pudimos confirmar que el efecto del Ba^{2+} externo sobre la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta no es un caso particular del mutante no

conductor *Shaker*H4 Δ 6-46 W434F, sino un efecto de la unión del Ba^{2+} a un sitio en el canal inactivado tipo C.

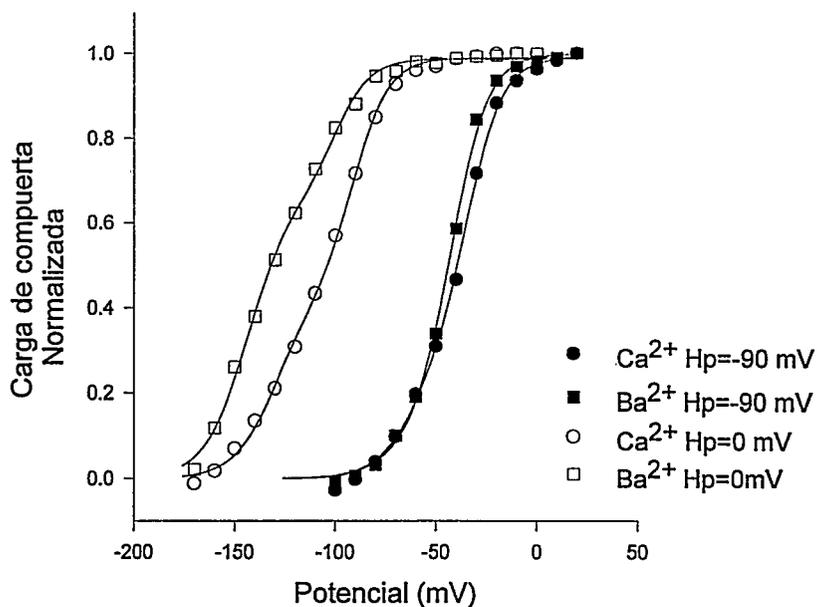


Figura 35. Curva de la carga de compuerta normalizada en función del potencial en el canal *Shaker*H4 Δ 6-46.

Curvas obtenidas con un $H_p = -90$ mV en Ca^{2+} (●) o Ba^{2+} (■), en el cual los canales están cerrados, o un $H_p = 0$ mV en Ca^{2+} (○) o en Ba^{2+} (□), en el cual los canales están inactivados. En todos los casos los pulsos fueron de 25 ms, y se integró la corriente on ($n=1$). Sólo cuando los canales parten de un estado inactivado tipo C el Ba^{2+} produce un corrimiento a la izquierda de la curva $Q(V)$. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación 8 y los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 1.

Nuestros resultados permiten concluir que la unión de Ba^{2+} al canal inactivado tipo C estabiliza la conformación del sensor de potencial en este estado.

5.3. *El Ba²⁺ se une al mismo sitio en el canal cerrado y en el canal en estado inactivado tipo C.*

El estudio del movimiento de las cargas de compuerta puede ser empleado para determinar si el sitio de unión de Ba²⁺ en el estado C inactivado es el mismo que el sitio de unión de Ba²⁺ en el estado cerrado. Nuestros resultados del estudio de corrientes macroscópicas del bloqueo por Ba²⁺ indicaron que una fracción del bloqueador que entró al estado inactivado tipo C, luego de repolarizar la membrana, sale desde un sitio equivalente al del bario que entró al estado cerrado. Esto podría indicar el sitio de unión del Ba²⁺ en el estado inactivado tipo C es el mismo que el sitio de unión del estado cerrado (ver esquema R-7). Hurst y col. (1997) estudiando el efecto de Ba²⁺ sobre la cinética de las corrientes de compuerta demostró que el ácido aspártico en posición 447 forma parte del sitio de unión a Ba²⁺ en el canal cerrado. Ellos observaron que en el mutante D447N el bario no afecta la cinética de la corriente off como ocurre en el canal silvestre (ver figura 33) y propusieron que esto se debe a una modificación del sitio que une Ba²⁺ de modo que el ion divalente no puede unirse al canal.

Estudiamos el efecto del Ba²⁺ sobre la dependencia del potencial del movimiento de cargas de compuerta en el mutante no conductor *ShakerH4* Δ6-46 D447N. Al comparar el movimiento de las cargas de compuerta en los canales cerrados verificamos que el Ba²⁺ no tiene efecto ni en la cantidad de carga movilizada a un mismo potencial ni en la cinética de las corrientes (Fig. 36). A diferencia de lo que ocurre en el canal silvestre, en el mutante D447N no hay efecto de Ba²⁺ sobre las

corrientes de compuerta de los canales inactivados tipo C. La cantidad de carga movilizada en respuesta a un potencial hiperpolarizante es la misma en presencia de Ca^{2+} o de Ba^{2+} externo (Fig. 37).

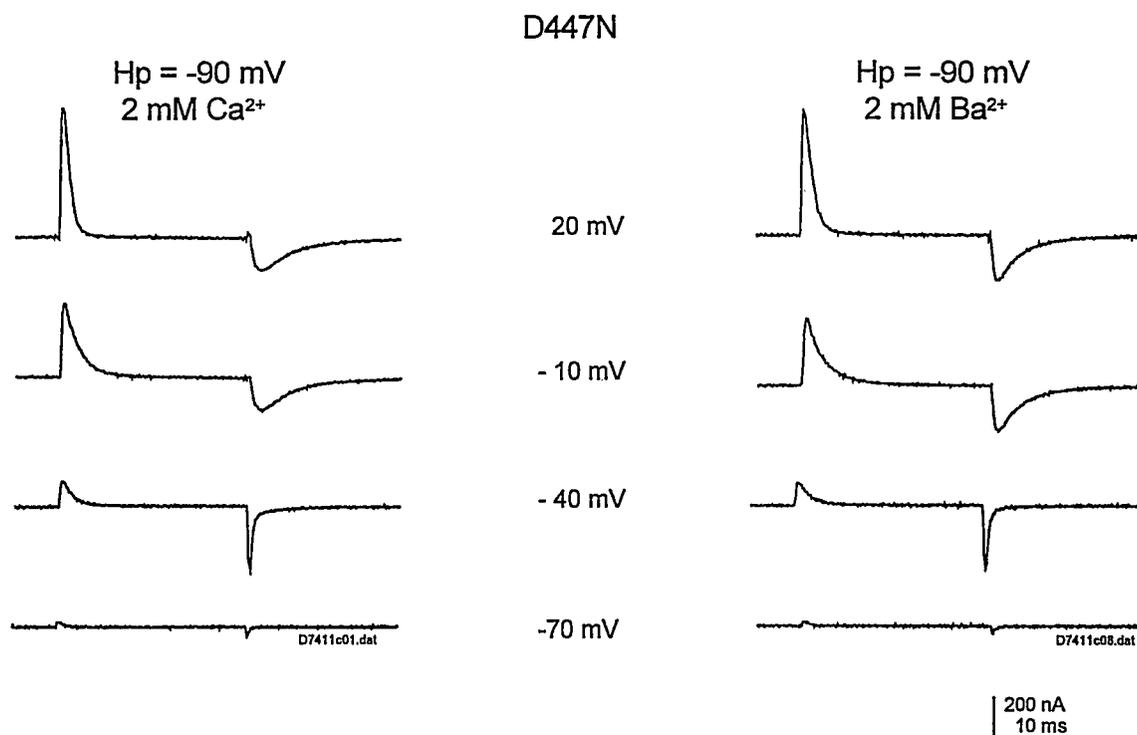


Figura 36. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447N en 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, con potencial de mantenci3n de -90 mV. A partir de un $\text{H}_p = -90$ mV (canales cerrados) se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados y se registraron las corrientes de compuerta.

De las curvas $Q(V)$ y del ajuste de los datos comprobamos que pr3cticamente no existe diferencia entre los $V_{1/2}$ obtenidos en presencia o ausencia de Ba^{2+} , ya sea en canales inactivados o canales cerrados. (Fig. 38 y tabla I). La 3nica diferencia en presencia de

Ba^{2+} es que el segundo componente de la curva $Q(V)$ parece tener un pequeño corrimiento a la izquierda en el eje del potencial.

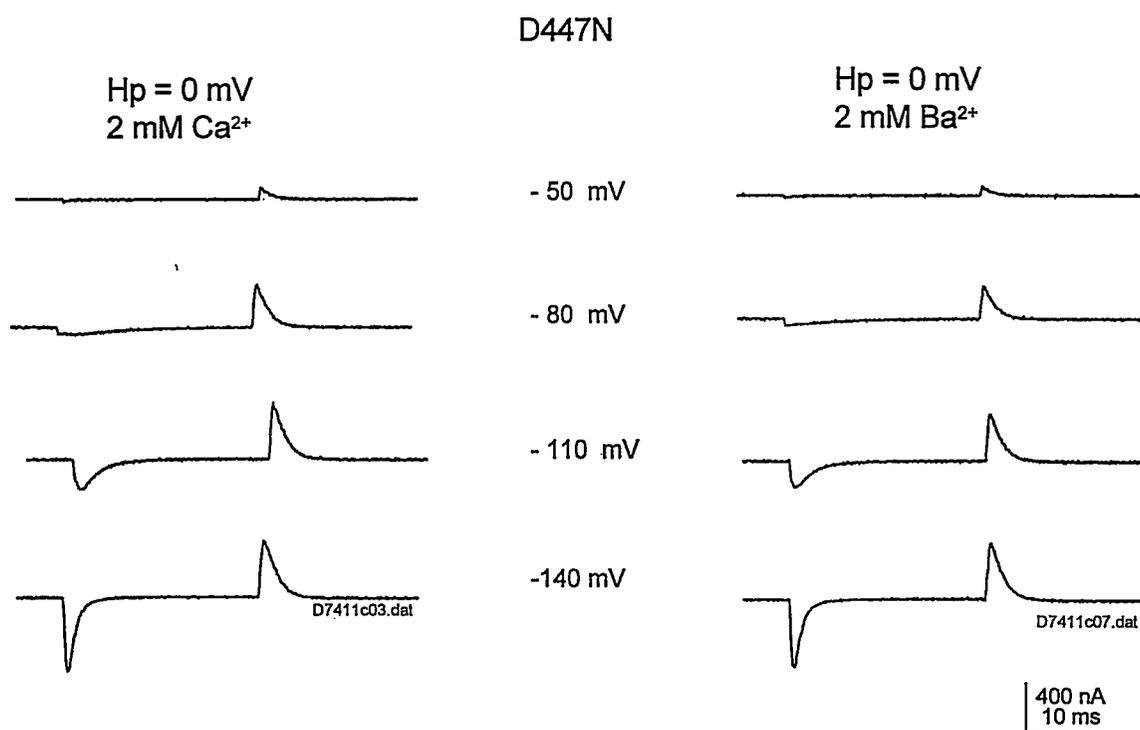


Figura 37. Registros de corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447N en 2 mM Ca^{2+} o 2 mM Ba^{2+} externo, con potencial de mantenci3n de 0 mV. A partir de un $H_p = 0$ mV (canales inactivados) se dieron pulsos de potencial de 25 ms a los potenciales indicados y se registraron las corrientes de compuerta.

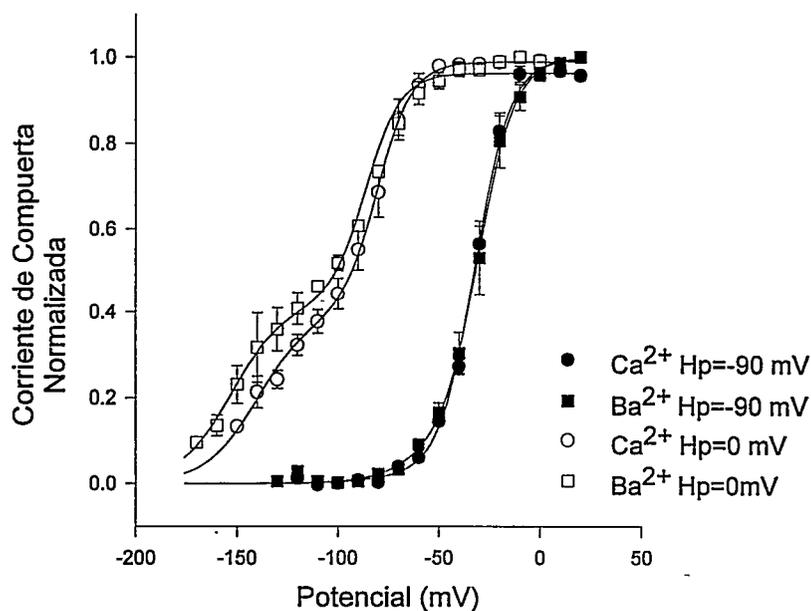


Figura 38. Curva de carga normalizada de compuerta en función del potencial en el canal *ShakerH4 Δ6-46 D447N*.

Curvas obtenidas con un $H_p = -90$ mV en Ca^{2+} (●) o Ba^{2+} (■), en el cual los canales están cerrados, o un $H_p = 0$ mV en Ca^{2+} (○) o en Ba^{2+} (□), en el cual los canales están inactivados. En todos los casos los pulsos fueron de 25 ms, y se integró la corriente on. (n=4). No se observa ningún efecto de Ba^{2+} . La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación 8 y los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 1.

Estos resultados indican que el sitio de unión de Ba^{2+} en el estado inactivado tipo C, que afecta el movimiento del sensor de potencial, es el mismo que el sitio de unión en el canal cerrado.

TABLA 1. Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas $Q(V)$ de canales inactivados ($H_p = 0$ mV)

	Z		V medio				Q		
			Ca ²⁺	Ba ²⁺	$V_{Ba} - V_{Ca}$ *	Ca ²⁺	Ba ²⁺		
WT n = 1	Z ₁	2.4	V ₁	-130	-143	13	q ₁	0,42	0,65
	Z ₂	2.8	V ₂	-91	-100	9	q ₂	0,57	0,33
W434F n = 3	Z ₁	1.3	V ₁	-119	-144	25	q ₁	0,27	0,70
	Z ₂	3.3	V ₂	-70	-80	10	q ₂	0,71	0,27
D447N n = 4	Z ₁	1.7	V ₁	-140	-152	12	q ₁	0,39	0,42
	Z ₂	3.3	V ₂	-81	-87	6	q ₂	0,60	0,54

datos obtenidos del ajuste de las curvas $Q(V)$ a la suma de dos Boltzmann (ec. 8).

* diferencia entre el valor de V medio en Ba²⁺ y V medio en Ca²⁺.

6. Existen dos clases de inactivación de tipo C?

Existen contradicciones experimentales que apuntan a que lo que llamamos la inactivación tipo C podría en realidad ser el reflejo de dos procesos moleculares distintos. Esta idea fue propuesta por De Biasi y col. (1993), quienes llamaron al proceso afectado por mutaciones en el poro inactivación de tipo P, para diferenciarlo del proceso descrito por Hoshi y col. (1991) que era afectado por una mutación en el segmento transmembranal S6, que llamaremos inactivación tipo S6.

Una indicación de que se trataría de dos procesos distintos fue el estudio de la dependencia del potencial de las corrientes de compuerta en canales cerrados y canales inactivados (Olcese y col., 1997). Ellos observaron un corrimiento a potenciales más negativos de la curva $Q(V)$ cuando los canales están inactivados respecto a cuando están cerrados. Los resultados obtenidos fueron los mismos para el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ y en *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F, siendo este último un canal no conductor (Perozo y col., 1993; esta tesis sección resultados 5.1 y 5.2)

Se ha propuesto que el canal W434F se inactivaría muy rápidamente, y tendría una muy baja probabilidad de apertura ($\approx 10^{-5}$), razón por la cual no es posible medir corrientes iónicas (Yang y col., 1997). Midiendo canales únicos se ha logrado determinar que la conductancia del canal abierto es normal. Si para cualquier potencial el canal está inactivado y el sensor esta siempre en la misma conformación, no se espera un cambio en la posición de la curva $Q(V)$ al variar el potencial de mantención (H_p). Sin embargo en el mutante W434F la curva $Q(V)$ varía su posición en el eje del potencial comportándose como el canal silvestre respecto a la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta. Una explicación para esta paradoja sería que el canal W434F esté constantemente inactivado tipo P, pero sufre un proceso de inactivación tipo S6. Este tipo de inactivación sería el que induce el cambio en la posición en el eje del potencial de la curva $Q(V)$.

El único canal en el cual no debiera observarse el corrimiento en la curva $Q(V)$ sería un canal que no presente inactivación de tipo P ni de tipo S6. Holgrem y col. (1997) describieron un mutante en la región del S6, *ShakerH4* $\Delta 6-46$ I470C, que tiene

la particularidad de no presentar decaimiento de la corriente iónica, vale decir un canal que no se inactiva. Decidimos verificar el comportamiento de las corrientes de compuerta en este mutante. Además, se estudio el doble mutante *ShakerH4* $\Delta 6-46$ T449V I470C, el cual tiene la mutación en el segmento transmembranal S6 pero también tiene una mutación en la región del poro.

6.1. *El canal ShakerH4 $\Delta 6-46$ I470C, un mutante de la inactivación tipo S6?*

Como fue descrito por Holgrem y col. (1997), este mutante puntual muestra una cinética de corriente iónica donde no se observa un decaimiento de la corriente iónica aún para pulsos de potenciales muy largos (Fig. 39). Este es el primer mutante de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ que no presenta inactivación.

En nuestro caso los registros muestran una leve caída de la corriente iónica y una corriente de entrada al término del pulso. Puesto que en el medio externo no había potasio y por lo tanto no existía un ion conductor que pasara desde el medio extracelular al medio intracelular, no esperábamos observar una corriente de entrada. La existencia de esta corriente nos indica que parte del K^+ que salió por los canales se acumuló en el lado externo de la membrana, volviendo entrar al repolarizarla.

Se estudió la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta luego de sacar todo el potasio del oocito. Se demostró que la curva $Q(V)$

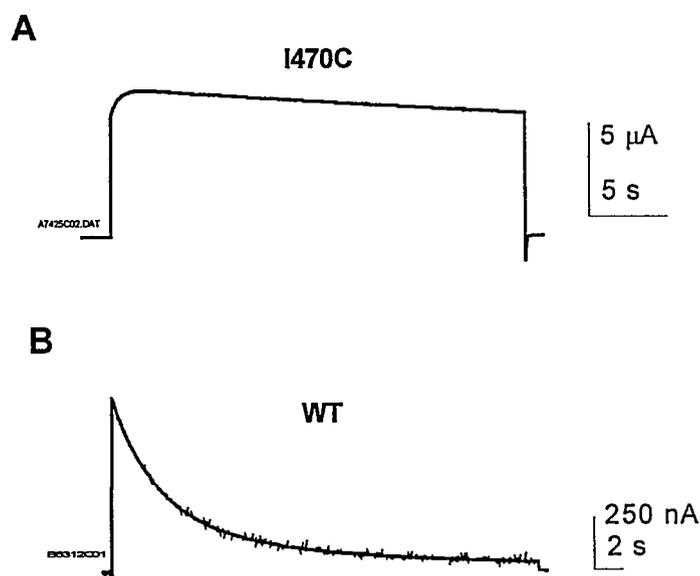


Figura 39. Corriente máscroscopica del mutante I470C.

(A) Registro del mutante I470C. Los registros se efectuaron en Cut-open oocyte, con un pulso a -10 mV por 30 s desde un $H_p = -90$ mV, en un medio externo sin potasio. (B)

Registro del canal WT. Los registros se efectuaron en Cut-open oocyte, con un pulso a -0 mV por 12 s desde un $H_p = -90$ mV, en un medio externo sin potasio.

en este caso presenta un corrimiento a potenciales hiperpolarizantes para H_p 0 mV respecto a H_p -90 mV, como ocurre en el canal WT. Sin embargo aquí, a diferencia del canal silvestre, los dos componentes de la curva H_p 0 mV están completamente separados (Fig. 40).

Este resultado se discutirá más adelante. Los corrimientos relativos del canal silvestre y de los mutantes a $H_p = 0$ mV se muestran en la figura 43, con el fin de poder apreciar claramente las diferencias.

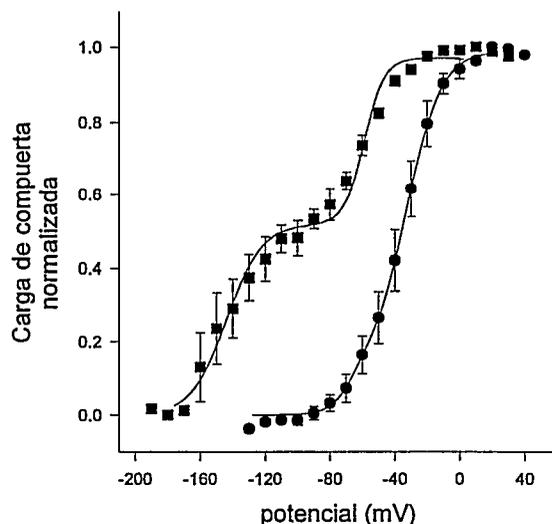


Figura 40. La curva $Q(V)$ del mutante I470C se mueve a potenciales hiperpolarizantes cuando el $H_p = 0\text{mV}$.

Se muestran las curvas de carga de compuerta normalizadas para canales que estaban a un $H_p = -90\text{ mV}$ (●) o un $H_p = 0\text{ mV}$ (■) de un promedio de 4 oocitos.

6.1.1. Un doble mutante que no se inactiva: *ShakerH4 Δ6-46 T449V I470C*.

El cDNA que codifica para el doble mutante T449V I470C fue gentilmente proporcionado por el Dr. Gary Yellen, Massachusetts General Hospital, USA. El canal que se expresa es una canal que no presenta decaimiento de la corriente iónica durante pulsos largos a 0 mV a partir de un $H_p = -90\text{ mV}$ (Fig. 41). Se estudió la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta, lo que se muestra en la figura 42. Es posible observar que hay un corrimiento de las curvas $Q(V)$ a potenciales hiperpolarizantes cuando los canales están a $H_p = 0\text{ mV}$, respecto

a los canales que están a $H_p = -90$ mV. Si consideramos que este canal no presenta ningún tipo de inactivación y tiene mutaciones en el S6 y el poro, esperaríamos que la posición de las curvas $Q(V)$ no cambiaran con el potencial de mantención. No fue posible distinguir experimentalmente la existencia de dos clases de inactivación de tipo C. Las posibles interpretaciones de estos resultados se tratarán en la sección de discusión de esta tesis.

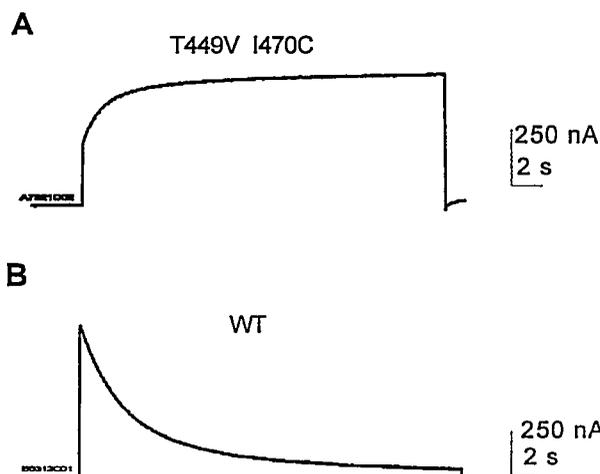


Figure 41. Corriente macroscópica del doble mutante T449V I470C.

Los registros se efectuaron en Cut-open oocyte, con un pulso a 0 mV por 12 s desde un $H_p = -90$ mV, en un medio externo sin potasio. (A) Registro del mutante T449V I470C (B) Registro del canal WT.

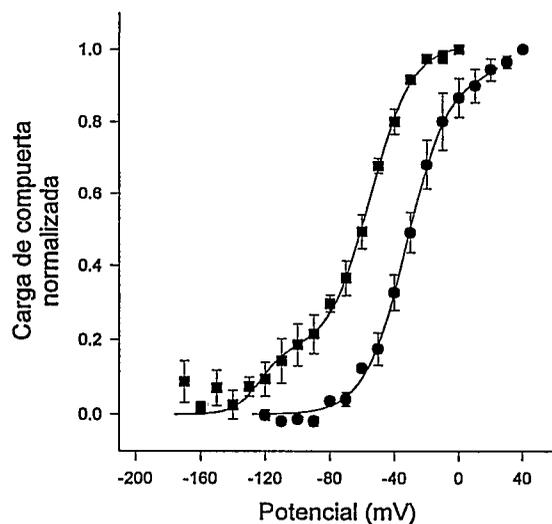


Figura 42. La curva $Q(V)$ del doble mutante T449V I470C se mueve a potenciales hipopolarizantes cuando el $H_p = 0$ mV.

Se muestran las curvas de carga de compuerta normalizadas para canales que estaban a un $H_p = -90$ mV (●) o un $H_p = 0$ mV (■) de un promedio de 3 oocitos.

Como se observa en la figura 43, el mutante I470C es el único que presenta una clara separación de los componentes de la curva de cargas de compuerta en función del potencial. Estando uno de sus componentes ubicado como WT y otro como W434F. El doble mutante T449V I470Cy el mutante W434F (descrito en la sección 5.1 de resultados) presentan ubicaciones muy similares en el eje del potencial.

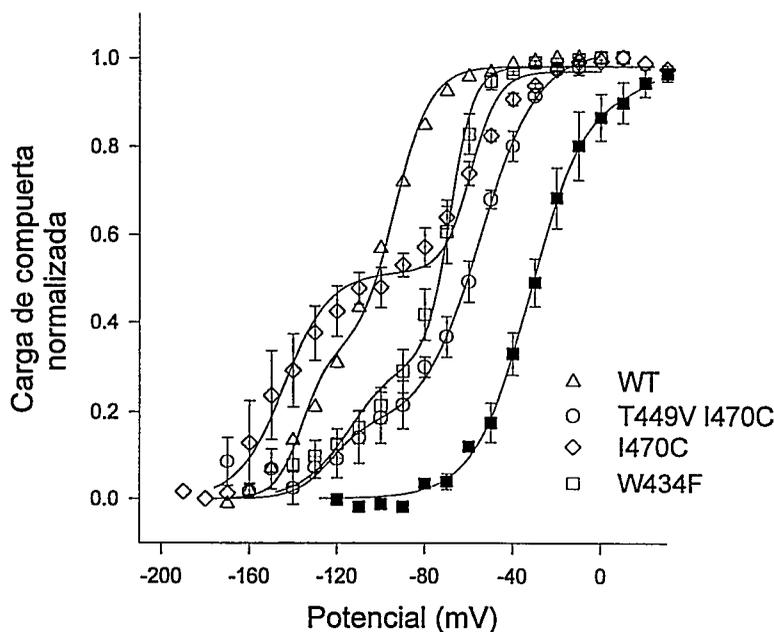


Figura 43. Curvas $Q(V)$ del canal silvestre y tres mutantes cuando el potencial de mantención es 0 mV.

Se comparan las posiciones de las curvas de carga de compuerta del canal silvestre con un mutante en la región S6 (I470C), un mutante de la región del poro (W434F) y el doble mutante T449V I470C. Como referencia se puso la curva $Q(V)$ para W434F (■) cuando el $H_p = -90$ mV.

DISCUSIÓN

Los canales de potasio dependientes del potencial (K_v), agrupados en la superfamilia de canales S4, son fundamentales para la excitabilidad de las células nerviosas y musculares. La variedad de canales K_v , surgida a través de la multiplicidad de genes, el "splicing" alternativo y la formación de canales heteroméricos, dan origen a una amplia gama de respuestas electrofisiológicas frente a una variación en el potencial de membrana. Esta respuesta está determinada por el tipo y número de canales presentes en cada célula. Los canales K_v fueron subdivididos en cuatro subfamilias: *Shaker*, *Shab*, *Shaw*, y *Shal* en *Drosophila melanogaster* o sus equivalentes en mamíferos $Kv1$, $Kv2$, $Kv3$ y $Kv4$ (Jegla y Salkoff, 1994). Cada una de estas subfamilias tienen distintas propiedades biofísicas.

Una de las propiedades biofísicas en la cual difieren los canales K_v de las distintas subfamilias es la capacidad de inactivarse, existiendo dos formas de inactivación: la inactivación de tipo N y la inactivación de tipo C. En el caso de la inactivación de tipo N o rápida, el mecanismo es el de la "bola y cadena". Se demostró que basta que una bola se una al receptor para que el canal se inactive. En el caso de la inactivación de tipo C, sólo en los últimos años se ha logrado proponer un mecanismo que podría dar cuenta de este proceso como así también de sus posibles moduladores. Se propuso que las subunidades del canal se aproximan entre sí generando una

constricción a nivel de la boca externa que impediría al flujo iónico (Yellen y col., 1994).

En esta tesis, estudiando el canal *ShakerH4* Δ6-46 al cual se le ha suprimido la inactivación de tipo N, se ha intentado dilucidar el mecanismo de inactivación tipo C, así como los cambios que ocurren en el canal cuando se inactiva. Todos los antecedentes en la literatura indican que la boca externa del canal se reordena durante la inactivación de tipo C. Intentamos esclarecer cuales son estos cambios, abordando primero la pregunta sobre cuantas subunidades participan en la inactivación de tipo C mediante el estudio de canales con diferentes subunidades. Esto permitió tener una idea de los cambios que debe sufrir el canal para inactivarse, restringiéndose con este resultado los posibles mecanismos. Además se estudió el comportamiento de canales con dos mutaciones, como una forma de determinar si existen interacciones entre los aminoácidos que afectan la inactivación de tipo C. Por otra parte, la accesibilidad al poro del canal en el estado inactivado fue estudiada empleando el bloqueador Ba^{2+} como una sonda del poro. Este ion tiene un radio iónico similar al del potasio pero puede asociarse en forma estable a la vía de conducción del canal bloqueando la corriente de K^+ . En vista de los resultado obtenidos en esta parte de la tesis, se estudió la posible estabilización del sensor de potencial en el estado inactivado tipo C con Ba^{2+} presente. El último punto estudiado fue la existencia de dos mecanismos de inactivación lenta, los que se intentaron aislar estudiando las corrientes de compuerta en algunos mutantes.

1. Reordenamiento de la boca externa del poro del canal.

En la naturaleza existen canales con distintas cinéticas de inactivación de tipo C. Al comparar las secuencias del poro se observa que estos canales presentan distintos amino ácidos en la posición equivalente a *Shaker* 449:

<i>Shaker</i> B	PDAFWWAVVTMTTVGYGDMTP
Kv1.1	PDAFWWAVVSMTTVGYGDMYP
Kv1.2	PDAFWWAVVSMTTVGYGDMVP
Kv1.3	PDAFWWAVVTMTTVGYGDMHP
Kv1.4	PDAFWWAVVTMTTVGYGDMKP

Fue comprobado experimentalmente que esta posición es determinante en la cinética de inactivación que presenta el canal. López-Barneo y col. (1993) mutaron el amino ácido 449 obteniendo canales con distintas cinéticas de inactivación de tipo C y distinta sensibilidad a la concentración de potasio externo.

El mecanismo propuesto para el proceso de inactivación de tipo C es la constricción de la boca externa del poro (Hoshi y col., 1991; Yellen y col., 1994), el cual ha sido apoyado por estudios en que se demuestra un cambio en la exposición de los aminoácidos ubicados en esta región (Yellen y col., 1994, Liu y col., 1996). La primera demostración de un cambio en la conformación de la región del poro fue proporcionada por Yellen y col. (1994) usando una mutación en que la treonina 449 fue substituida por una cisteína. Los autores observaron un aumento de la afinidad aparente del canal por el Cd^{2+} , cuando el canal pasa del estado abierto al estado inactivado. Es decir, las cisteínas 449 coordinarían mejor el cadmio cuando el canal

está en estado inactivado respecto a cuando esta abierto. Este cambio en la afinidad podría deberse a una aproximación de los residuos 449, la cual ocurriría durante la inactivación de tipo C. También es posible explicar el cambio de afinidad del canal por el cadmio como una modificación de la exposición de estos residuos, siendo más accesibles en el estado inactivado que en el abierto. En forma análoga, estas dos posibilidades permiten explicar los resultados obtenidos con el bloqueador CP-339.818, el cual se une en forma específica al estado inactivado y no al estado abierto ni al cerrado (Nguyen y col., 1996). Por otra parte, se al mutar uno por uno los residuos 448, 449 y 450 a cisteina, se demostró que había una aproximación entre los residuos 448 al inactivarse el canal, que permitía la formación de puentes disulfuros. Los residuos 449 y 450 son más accesibles en el estado inactivado tipo C respecto a los estados cerrado y abierto, pero no forman puentes disulfuros entre ellos (Liu y col., 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que la ocupación del canal por TEA externo hace la inactivación más lenta, proponiéndose que actuaría como un "tope" que impide la constricción (Choi y col., 1991; López-Barneo y col., 1993). Todos estos antecedentes apoyan el mecanismo de constricción a nivel de la boca externa del poro para la inactivación de tipo C. Esto implica que las cuatro subunidades se aproximan entre si hasta impedir el flujo iónico.

Un nuevo antecedente surgido recientemente ha cuestionado el modelo de inactivación de tipo C: los canales inactivados no pueden conducir K^+ pero si pueden

conducir Na^+ y Li^+ en ausencia de K^+ intracelular (Starkus y col., 1997). En condiciones fisiológicas, el K^+ interno bloquearía la conducción del Na^+ de los canales inactivados. Aunque estos resultados no contradicen la existencia de un cambio conformacional en el cual se aproximan las subunidades durante la inactivación de tipo C, indican que una modificación de la permeabilidad del canal sería la responsable de la detención del flujo de los iones K^+ . El canal en estado inactivado no sería permeable al potasio pero si a otros iones, lo cual indica que la constricción no es completa.

El canal Kv 2.1, el cual presenta una cisteína en la posición equivalente a 463 (segmento S6) de *Shaker*, es capaz de conducir Na^+ en ausencia de K^+ en el estado abierto. Si bien el canal *Shaker* silvestre no es capaz de conducir Na^+ en el estado abierto, el mutante puntual A463C sí lo hace (Oglieska y Aldrich, 1997). El residuo en posición 463 fue el primer amino ácido implicado en la inactivación de tipo C (Hoshi y col., 1991). Se demostró que la diferencia en la cinética de inactivación de tipo C entre el canal *Shaker* A y el *Shaker* B era explicada porque en el primer caso el residuo 463 era una valina y en el otro una alanina. Sería posible entonces que las mutaciones que afectan la inactivación de tipo C estén modificando la permeabilidad al potasio del estado inactivado tipo C.

La interrogante sobre el mecanismo de inactivación de tipo C sigue sin una respuesta final. La demostración que el canal en estado inactivado es capaz de conducir iones, distintos al potasio, demuestra que la inactivación no es un colapso completo de la boca externa del canal, pero no desmiente los antecedentes de cambio de

accesibilidad de los residuos que la conforman.

1.1. Todas las subunidades del canal participan en la inactivación de tipo C.

En el caso de la inactivación de tipo N cualquiera de las bolas presente en cada subunidad puede bloquear el canal, actuando en forma independiente unas de otras. En el caso de la inactivación de tipo C los resultados muestran una aproximación entre residuos del poro, aunque no se sabe si las cuatro subunidades se aproximan. Una explicación alternativa a esta sería que la inactivación de tipo C modifica la exposición o localización de sólo una de las subunidades, y esta una subunidad o una región de ella adoptaría una conformación que impide el flujo iónico. El cambio de permeabilidad en el estado inactivado tipo C no se contradice con los resultados que muestran un cambio en la posición de los residuos de la boca del canal, siendo razonable pensar que este cambio en la permeabilidad se deba a un reordenamiento de los residuos en el poro.

Con el fin de determinar si todas las subunidades participan en la inactivación de tipo C, estudiamos el comportamiento cinético de canales formados por dos tipos de subunidades.

1.1.1. Mezclas de subunidades.

Se analizaron dos mezclas: T449S con T449Y y WT con T449Y. En ambos casos la cinética de inactivación de la mezcla difiere de las cinéticas de los canales

homotetraméricos, indicándonos que las subunidades se estaban mezclando. En el caso de la mezcla de T449S con T449Y, la caída de la corriente debió ser ajustada con dos exponenciales, una de las cuales es similar a la de los canales formados únicamente por subunidades rápidas (T449S), los cuales constituían un 32 % del total de los canales presentes. La cinética de inactivación de la otra mezcla se ajustó con una sola exponencial; que corresponde a la suma de las funciones exponenciales que describen el proceso para cada una de las cinco clases de canales multiplicada por la fracción en que se encuentra presente cada canal.

Existen tres alternativas de comportamiento de las subunidades en el proceso de inactivación tipo C en canales resultantes de la coinyección de dos mRNA:

i. *Segregación de las subunidades*: Con anterioridad se había demostrado que subunidades con distintas mutaciones puntuales (MacKinnon, 1991) o incluso con la supresión del extremo amino terminal (Isacoff y col., 1990) se mezclan al azar para formar canales heteroméricos, y por lo tanto es posible predecir las proporciones de los canales formados según la distribución binomial. A pesar de estas evidencias es necesario descartar en nuestro caso la segregación de subunidades.

Nuestros resultados rechazan que las subunidades no se mezclan. En el caso que las subunidades no se mezclaran la predicción para la coinyección es la suma de corrientes ponderada por la proporción en que se inyectó cada subunidad. La cinética de inactivación que se predice diverge de los resultados experimentales. Nuestros datos concuerdan, como ha sido observado para todos los casos estudiados, con una mezcla

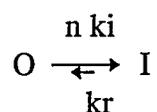
al azar de las subunidades del canal *Shaker* para formar canales tetrámicos.

ii. *Modificación de una subunidad en forma independiente:* En este caso basta la modificación conformacional de una de ellas para que se detenga el flujo iónico, pasando el canal al estado inactivado. Nuestros resultados tampoco se pueden explicar con este modelo de inactivación tipo C. Este mecanismo podría haber descartado el modelo propuesto por Yellen y col. (1994) en el cual la inactivación de tipo C es una constricción de la boca externa del poro ya que esto supone la participación de todas las subunidades del canal.

Hodgkin y Huxley (1952) explicaron la dependencia del potencial de las conductancias de Na^+ y de K^+ suponiendo que existían partículas cargadas que pasaban de un estado no permisivo a uno permisivo. En el caso de la corriente de K^+ se postularon cuatro partículas para el proceso de activación (estos canales de K^+ no tienen inactivación). El desarrollo matemático del modelo de potencial de acción tiene como supuesto que existen partículas cargadas que se mueven entre el estado permisivo y no permisivo en forma independiente. Como consecuencia, la cinética de activación de la corriente de K^+ es proporcional a la cuarta potencia de una función exponencial. Sin embargo la desactivación es un proceso monoexponencial. Esto se debe a que basta que una partícula pase al estado no permisivo para que el canal deje de conducir. Por lo tanto, un proceso con n partículas independientes, en que sólo se necesita el cambio de estado de una de ellas, sigue una cinética monoexponencial.

En el caso de la inactivación de tipo N, se demostró que un sólo extremo amino

terminal era capaz de bloquear el canal (MacKinnon y col., 1993). Se estudio la relación de la constante de tiempo de inactivación con la fracción de canales que se inactivan, para distintas proporciones de mezclas de subunidades con bola de inactivación y subunidades sin bolas. En este caso se demostró que la constante cinética de inactivación es proporcional al número de bolas que tiene el canal. Para un modelo cinético



donde n es el número de bolas, k_i la constante cinética de inactivación del canal con una bola y k_r la constante cinética de recuperación. Si la k_r es despreciable respecto a k_i , la constante de tiempo de relajación es inversamente proporcional al número de bolas ($\tau_i = 1/n k_i$).

En el caso de la inactivación de tipo C podemos pensar en un modelo equivalente, para una mezcla de subunidades que forman canales que se inactivan completamente (donde $k_r \approx 0$) con subunidades que forman canales que no lo hacen. En este caso τ_i es inversamente proporcional al número de subunidades que se inactivan, siendo posible predecir la constante de tiempo para cada clase de canal (ec. 4 en métodos). La cinética de inactivación de la mezcla sería la suma de las cinéticas de cada una de las clases de canales ponderada por la fracción que se espera de cada una de ellas (ec. 5 en métodos).

Nuestros resultados experimentales no concuerdan con la cinética de

inactivación que predice este modelo (ver figura 19), y por lo tanto podemos descartarlo. La inactivación de tipo C, a diferencia de la inactivación de tipo N, no es producida por el cambio conformacional de una sola subunidad.

iii. *Modificación de todas las subunidades:* la tercera posibilidad, que no podemos descartar con nuestros resultados, es que se requiera que todas las subunidades lleguen a la conformación inactivada para que el canal se inactive. En este caso en que las cuatro subunidades participan en el proceso de inactivación de tipo C existen tres posibilidades: las subunidades son independientes entre ellas, las subunidades actúan en forma cooperativa o las subunidades actúan en forma concertada. Nuestros resultados no nos permiten distinguir entre estas tres posibilidades.

En el caso de subunidades independientes la constante de tiempo de los canales heterotetraméricos sería igual o mayor que la constante de tiempo de una subunidad lenta. Si pensamos en un caso extremo en el cual mezclamos subunidades de inactivación rápida con subunidades que no se inactivan, todos los canales que tengan al menos una subunidad no inactivante no podrían pasar al estado inactivado tipo C.

En un proceso de inactivación cooperativo el paso de una subunidad al estado inactivado facilitaría el cambio conformacional de las otras subunidades. En el caso de cooperatividad perfecta, todas las subunidades pasan del estado abierto al estado inactivado en forma concertada.

El estudio del comportamiento cinético de los canales obtenidos a partir de la

mezcla nos permite descartar la posibilidad de que sólo una subunidad determine la inactivación del canal. Podemos proponer un proceso de inactivación de tipo C en el cual participan todas las subunidades del canal. Sin embargo, el estudio de una sola clase de canal por separado permite un análisis más preciso del problema. Por esta razón construimos dímeros de subunidades.

1.1.2. *Dímeros de subunidades.*

Los dímeros de subunidades al ensamblarse formarían canales con dos subunidades de un tipo y dos de otra (Fig. 44A). Existen antecedentes que apoyan la posibilidad de un ensamblaje de canales normales a partir de dímeros. El ensamblaje de canales a partir de dímeros fue estudiado por Isacoff y col. (1990) demostrando que es posible obtener canales de dímeros WT-WT de comportamiento silvestre y que no importa el orden en que se ligan subunidades mutantes. Es decir, el comportamiento de los canales ensamblados a partir de dímeros A-B es el mismo que para dímeros B-A. Heginbothman y Mackinnon (1992) mostraron que la constante de afinidad por TEA de un canal formado por cuatro subunidades es la misma que la de un canal formado por dímeros de subunidades. Concluyendo que las interacciones del bloqueador con el canal no fueron modificadas por el ensamblaje del dímero.

Sin embargo McCormack y col. (1992), describieron un caso en el cual el orden de las subunidades en el dímero modificaba las propiedades del canal que se obtiene: el canal formado por dímeros A-B no se comporta como el canal formado por

dímeros B-A. Se postuló que en algunos casos podría ocurrir ensamblaje de más de dos dímeros, en el cual algunas subunidades están adyacentes al canal y no participan en la formación de la vía de conducción (Fig. 44).

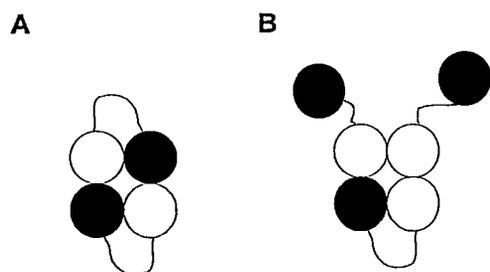


Figura 44. Posibles formas de ensamblaje de un dímero.

(A) Ensamblaje correcto de un dímero (○-●) en un canal con cuatro subunidades. (B). Una de las posibles forma de ensamblaje incorrecto del dímero. Cuatro subunidades participan en la formación de la vía de conducción (◇) y otras 2 están adyacentes.

Con el fin de obtener una sola clase de canal con distintas subunidades construimos dímeros. Se construyó el dímero con una subunidad silvestre (WT) y otra T449Y, de modo que obtuvimos canales con dos subunidades WT y dos subunidades T449Y. La constante de tiempo de este dímero es de 5200 ms siendo intermedia respecto a la constante de tiempo del canal silvestre y la del canal T449Y. Se pudo verificar, como se observó en las coinyecciones, que ninguna de las subunidades determina la cinética de inactivación del canal. En este caso en particular no es posible discriminar entre un modelo de acción concertada, en el cual la contribución a la energía libre de la reacción de cada subunidad es equivalente, o un modelo de independencia en el cual la constantes de velocidad del dímero es la suma de las constantes de las subunidades (ver anexo 2). El dímero con una subunidad T449S y otra T449Y también fue construido, aunque no logramos obtener registros de corriente iónica.

En el caso del dímero WT- T449Y no fue posible verificar el efecto de alternar el orden de las subunidades, ya que el dímero de orden inverso, T449Y-WT, no expresó corriente iónica. Construimos entonces, los dímeros WT-T449C y T449C-WT, obteniendo valores para la constante de tiempo de inactivación muy similares entre ellos. En este caso las cinéticas de inactivación del canal formado únicamente por subunidades T449C fue ajustada con dos constantes de tiempo, en tanto la cinética de los dímeros se ajustaron con una sola constante de tiempo que resultó ser a su vez similar a la del canal silvestre. Este resultado es opuesto al obtenido con el otro dímero y con las coinyecciones, que indican que la cinética de inactivación del canal no es determinada por ninguna de las subunidades. Los reemplazos con cisteínas podrían tener un efecto secundario producto de la capacidad de formar puentes disulfuros de estos amino ácidos. Quizás la cinética del canal homotetrámero T449C, que fue ajustada con dos exponenciales, esté afectada por una proporción de canales con puentes disulfuros. En el caso del dímero sólo están presente dos cisteínas, que podrían quedar en oposición dentro del canal, y que podríamos pensar, no forman puentes disulfuros. Esta podría ser la razón de que el dímero se comporte como un canal silvestre a pesar que el canal homotetrámero presente una cinética de inactivación que no es como la del canal silvestre.

1.1.3. *Todas las subunidades participan en forma cooperativa en la inactivación de tipo C.*

Durante el desarrollo de esta primera parte de la tesis aparecieron dos trabajos en la literatura que, usando las mismas aproximaciones experimentales, postularon que la inactivación de tipo C es un proceso cooperativo. Los resultados mostrados en estos trabajos descartan, como lo indican nuestros resultados, que una sola subunidad determine el proceso de inactivación. En el primero de los trabajos se estudiaron las cinéticas de inactivación de canales resultantes de la coinyección de subunidades silvestre y mutante A413V del canal K_v 1.3 (Panyi y col., 1995). Demostraron que la suposición de un modelo cooperativo permite describir los resultados experimentales. En el modelo cooperativo o concertado la energía libre de la transición al estado inactivado del canal es la suma de la energía libre de cada subunidad (ver anexo 2). Por otra parte, Ogleska y col. (1995) confirmaron el mecanismo concertado usando un dímero de subunidades.

La unión del TEA al canal en estado abierto es cooperativa y todas las subunidades interactúan con el bloqueador (Heginbotham y MacKinnon, 1992, Kavanaugh y col., 1992) apoyando la idea de simetría en la boca del poro. Al pasar al estado inactivado el canal sufriría un proceso que involucra la modificación conformacional de todas las subunidades en forma cooperativa.

La participación de las subunidades en forma concertada indica que el proceso de inactivación involucra un cambio conformacional del canal y no de una sola

subunidad. En el modelo extremo de inactivación de tipo C por constricción se supuso la participación de las cuatro subunidades, aunque no se conoce el número de residuos de cisteína que participan en la coordinación del cadmio.

En el caso del modelo de cambio de permeabilidad del estado inactivado se podría pensar que el cambio en la posición de un amino ácido modificaría en forma drámatica la selectividad del canal. Conociendo los resultados aquí presentados y los de la literatura, que muestran la participación concertada de todas las subunidades del canal en la inactivación, el cambio en la permeabilidad parecería ser el resultado de un cambio en la posición de al menos una región de las cuatro subunidades.

1.2. Interacciones de aminoácidos en el proceso de inactivación de tipo C.

El proceso de inactivación de tipo C fue descrito en términos del efecto de mutantes puntuales sobre su cinética, estudiándose en particular el efecto de las mutaciones en el residuo de la posición 449. Otro aminoácido involucrado en el proceso de inactivación de tipo C es el ácido aspártico 447, que al ser mutado a ácido glutámico (D447E) genera un canal con una inactivación tan rápida como la inactivación de tipo N. Intentamos dilucidar si los efectos de las mutaciones en estas dos posiciones son independientes o existe una interacción entre ellos. Estudiamos la cinética de inactivación del canal D447E con una segunda mutación en el residuo 449. En la segunda mutación se reemplazó la treonina 449 por aminoácidos que enlentecen la inactivación, es decir histidina, valina y tirosina (ver figura 6).

La recuperación de una función que se ha perdido por efecto de una mutación, con un segundo cambio en la secuencia primaria es un método utilizado para identificar pares de residuos que interactúan en una proteína. Esta aproximación se conoce como supresión intragénica. Un ejemplo del uso de esta metodología es la recuperación de la expresión de canal *Shaker* que se ha perdido como consecuencia de una mutación única en el segmento S4, con una segunda mutación en el segmento S2 o S3. Con estos mutantes dobles se estableció la interacción de aminoácidos con carga positiva ubicados en el segmento transmembranal S4 con aminoácidos de carga negativa de los segmentos transmembranales S2 y S3 (se explica con mayor detalle en la sección 2.3 de la introducción). En el caso descrito anteriormente, la neutralización de una carga positiva del S4 es compensada con la neutralización de la carga negativa (S2 o S3) con la cual interactuaba, lo que permite la expresión funcional del canal.

En nuestro caso logramos obtener un canal de comportamiento silvestre cuando hicimos la doble mutación D447E T449Y; sin embargo en los otros dos casos, D447E T449V y D447E T449H la recuperación fue parcial o nula, respectivamente. Los efectos de estas mutaciones no son aditivas, es decir no basta tener un amino ácido en posición 447 que determine un canal de inactivación rápida (D447E) y un amino ácido en posición 449 que determine un canal de inactivación lenta (T449Y, T449V o T449H) para obtener un canal normal. La naturaleza química del amino ácido en posición 449 afecta el proceso de inactivación. Esto indica que existe una interacción, ya sea directa o indirecta, entre los residuos ubicados en las posiciones mutadas y que

esta interacción es importante para el proceso de inactivación de tipo C.

Puesto que estos dos residuos son cercanos y que se ha relacionado la posición 449 con el efecto de los iones externos en la inactivación de tipo C, se puede plantear que ellos forman parte de un sitio de unión de K^+ . Los distintos efectos obtenidos, a pesar de tener siempre un amino ácido que determina una cinética de inactivación lenta en la posición 449, podrían explicarse si ellos forman parte de un sitio capaz de coordinar un ion potasio. Es muy probable que las distancias moleculares así como la naturaleza química de los aminoácidos resulten fundamentales para la interacción sitio-ion.

La localización precisa de los sitios de unión a iones en la vía de conducción no ha sido posible, aunque existen varios antecedentes. En el canal cerrado existe un sitio de unión de Ba^{2+} que se localiza en el 25 % del campo eléctrico ($\delta=0,25$) formado en parte por el residuo 447 (Hurst y col., 1996). La participación del amino ácido 447 en la unión del Ba^{2+} apoya la idea que este residuo forma parte de un sitio de unión que sería afectado por nuestras dobles mutaciones.

Por otra parte, Baukrowitz y Yellen (1995) estudiaron el efecto que tiene el flujo de potasio a través del poro en la inactivación de tipo C. Ellos observaron que cuando el canal tiene inactivación de tipo N y estimula con pulsos despolarizantes repetidos se produce acumulación de la inactivación de tipo C. Esta acumulación ocurre en canales sin bola de inactivación solamente en un medio sin potasio externo. La conclusión obtenida de estos resultados es que existiría un sitio en el poro del canal

que debe vaciarse para que el canal se inactive tipo C. Si la bola bloquea el flujo de iones potasio el sitio se vacía y el canal entra al estado inactivado tipo C, enlenteciendo además la recuperación. Todos estos resultados fueron analizados pensando que la boca externa del canal se colapsa y que por lo tanto el sitio debe vaciarse para que el colapso ocurra. Posteriormente los mismos autores (Baukrowitz y Yellen, 1996) describieron un sitio de potasio modulador de este proceso con una constante de disociación de 2 mM y que se localizaría en el 50% del campo eléctrico ($\delta=0,5$). El Na^+ tiene poco efecto sobre la inactivación de tipo C, por lo que se propuso que el sitio de unión para K^+ estaba en la vía de conducción del canal. La modificación de la cinética de inactivación en nuestros mutantes dobles podría interpretarse en términos de un cambio en la afinidad del K^+ por su sitio. Este cambio en la afinidad podría a su vez determinar la velocidad en el cambio de permeabilidad que ocurriría durante la inactivación de tipo C.

En un principio se pensó que el sitio de K^+ modulador de la inactivación de tipo C podía ser el mismo que el sitio de TEA (López-Barneo y col., 1993). Los efectos de las mutaciones en el residuo 449 (que conforman el sitio de TEA) modifican el efecto de la concentración de K^+ externa en la cinética de inactivación. Sin embargo, recientemente Molina y col., (1997) propusieron que el sitio de K^+ es más interno que el sitio de TEA, que se localiza en el 20 % del campo eléctrico. Como consecuencia de esto el residuo 449 no formaría parte de el sitio de unión de K^+ , pero si podría afectar la accesibilidad del ion a su sitio.

Otro caso de interacción entre residuos importantes para la inactivación fue descrito por Ogielska y col. (1995), en que mostraron la interacción del residuo 449 con el residuo 463, que se ubica en el segmento transmembranal S6. Esta interacción ocurre incluso entre residuos de subunidades distintas, y puesto que el segmento S6 formaría parte de la vía de conducción (Shieh y Kirsch, 1994) se postuló que estos residuos estarían afectando indirectamente la ocupación iónica de la vía de conducción. Es posible entonces que los cambios en los residuos 447 y 449 afecten la vía de acceso del potasio a su sitio, modificando la barrera energética que debe superar este ion y no el sitio de unión directamente. Los cambios en la velocidad de inactivación serían el reflejo de cambios en la velocidad de entrada y salida del potasio, modificándose la probabilidad de que el sitio se vacíe y el canal se inactive.

1.3. *Accesibilidad de la boca externa del poro del canal durante el estado inactivado tipo C.*

Como fue demostrado en esta tesis y en los trabajos de Panyi y col. (1995) y Ogielska y col. (1995), el proceso de inactivación de tipo C involucra la participación todas las subunidades. Esto concuerda con el aumento de afinidad por el cadmio del canal mutante T449C cuando pasa del estado abierto al estado inactivado tipo C. (Yellen y col., 1994), así como con los resultados de modificación de la cinética de inactivación de tipo C por TEA externo (Choi y col., 1991; López-Barneo y col., 1993). Estos antecedentes fueron expuestos con mayor detalle en la introducción y en

la sección 1 de la discusión. Los antecedentes aportados por estos trabajos no indicaron la extensión del reordenamiento de la boca externa del canal, ya que en ambos casos se modificó sólo el residuo en posición 449. El primer indicio de que el cambio ocurre en gran parte del vestíbulo externo del poro fueron los cambios en la accesibilidad de varios residuos que ocurre cuando el canal se inactiva, estudiado por Liu y col. (1996). Recientemente, Molina y col. (1997) propusieron que el sitio de TEA es distinto al sitio de K^+ modulador de la inactivación de tipo C, y que el cambio estructural que ocurre cuando el canal pasa desde el estado abierto al estado inactivado tipo C sería en un sitio muy restringido. Los antecedentes antes mencionados, y el hecho que mutaciones en zonas del canal como el segmento transmembranal S6 afecten la inactivación, así como nuestros experimentos de accesibilidad del Ba^{2+} , parecen descartar la posibilidad de una reestructuración restringida. Los resultados de la unión de Ba^{2+} al canal en estado inactivado indican que este ion se une a un sitio que resultaría de la modificación de los dos sitios presentes en el canal cerrado y que la barrera energética que debe superar el Ba^{2+} para alcanzar su sitio se ubica fuera del campo eléctrico (ver sección 1.3.2).

Los resultados de Starkus y col. (1997) que muestran que los canales inactivados son capaces de conducir Na^+ y Li^+ en ausencia de K^+ , no descartan que ocurra la constricción del poro del canal. Sin embargo, la aparición de un estado inactivado que no permite el flujo de iones K^+ , tiene un origen distinto. En el modelo de la constricción, la vía de conducción o parte de ella colapsa impidiendo el flujo

iónico en forma mecánica. En el caso del modelo de cambio de permeabilidad la detención del flujo iónico sería el resultado de la pérdida de permeabilidad del canal al K^+ , y modificación de la permeabilidad al Na^+ y al Li^+ . Nuestros resultados de bloqueo del estado inactivado por Ba^{2+} nos indican que la constricción ocurre aunque no es completa, puesto que el Ba^{2+} alcanza lentamente su sitio. Es posible que la constricción del poro vaya acompañada de un cambio en la selectividad puesto que la ubicación de los amino ácidos que forman el filtro de selectividad se modificaría.

1.3.1. *El Ba^{2+} puede unirse a un sitio en el canal inactivado.*

Estudiamos la accesibilidad del Ba^{2+} al poro del canal en estado inactivado tipo C para determinar si la constricción del vestíbulo externo impide el acceso de este ion y qué tan extenso es el reordenamiento. Puesto que la inactivación del canal *Shaker* es incompleta, luego de despolarizar la membrana, el Ba^{2+} aplicado externamente podría unirse a al estado abierto y al estado inactivado. Demostramos que el bario es capaz de acceder al canal inactivado, en una reacción bimolecular, es decir un Ba^{2+} se uniría a un sitio único. Durante el desarrollo de esta tesis, Levy y Deutsh (1996b) demostraron que el estado inactivado tipo C del canal Kv1.3 es accesible para el K^+ externo, y sus resultados concuerdan con un modelo de unión y disociación muy lenta del K^+ a su sitio. En el caso del canal Kv1.3 el potasio externo se une a un sitio que se ubica en el 30 % del campo eléctrico, y desestabiliza el estado inactivado. En nuestro caso la formación del complejo canal inactivado- Ba^{2+} es irreversible, al menos en los períodos

de tiempo estudiados.

Dado que el K^+ ($r = 1.33 \text{ \AA}$) tiene el mismo radio iónico que el Ba^{2+} ($r = 1.35 \text{ \AA}$) podríamos pensar que estos dos iones acceden al mismo sitio en el canal inactivado y que la diferencia en la capacidad de disociarse se explica porque el bario tiene una valencia +2 (lo que hace la unión irreversible) y el potasio sólo +1. La constante de asociación obtenida de nuestros datos para Ba^{2+} es de $0,14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que considerando una frecuencia vibracional promedio para una reacción bimolecular de $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Moore 1972), nos permite estimar una barrera de energía para el proceso de entrada de 16.2 Kcal/mol a partir de la ecuación

$$\Delta G_{on}^{\ddagger} = -RT \ln (k_{on}/\phi) \quad (\text{ec. 11})$$

donde ΔG_{on}^{\ddagger} es la energía de activación de entrada, R es la constante universal de los gases, T la temperatura en grados Kelvin, k_{on} es la constante de asociación y ϕ la frecuencia vibracional. El Ba^{2+} debe superar esta barrera de energía para acceder a su sitio donde queda atrapado. Posiblemente el pozo de energía en el se ubica el sitio de unión a Ba^{2+} es muy profundo, siendo muy grande la diferencia de energía entre el pozo y el máximo de la barrera. Puesto que luego de 15 min de lavado no observamos decaimiento en la fracción de canales bloqueados, podemos decir que el $\tau_{off} \gg 15 \text{ min}$ y $k_{off} \ll 1.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Luego la constante de disociación del Ba^{2+} al estado inactivado (K_d) es menor que $7.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. La energía de activación de salida sería mayor que 21.5 Kcal/mol , suponiendo una energía de vibraciones de $6,6 \cdot 10^{12} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (Fig. 45). La barrera de energía se localizaría fuera del campo eléctrico, ya que la

constante de asociación es independiente del potencial.

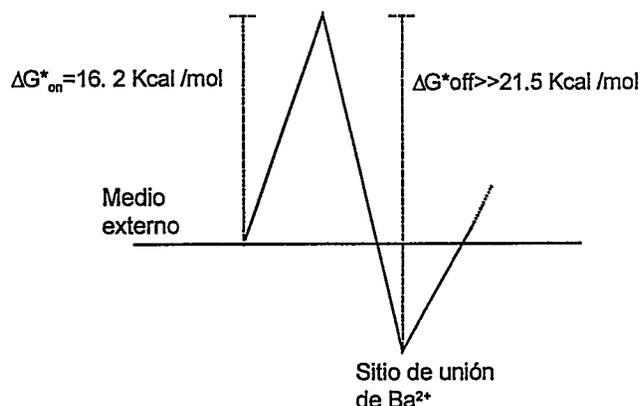
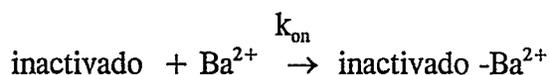


Figura 45. Diagrama de energía de la unión del Ba^{2+} al estado inactivado. A partir de la constante k_{on} pudimos calcular un ΔG^*_{on} de 16.2 Kcal/mol. El ΔG^*_{off} debe ser mayor que 21.5 Kcal/mol, puesto que en 15 min de lavado no observamos salida del Ba^{2+} desde su sitio. El máximo de la barrera de energía se ubica fuera del campo eléctrico.

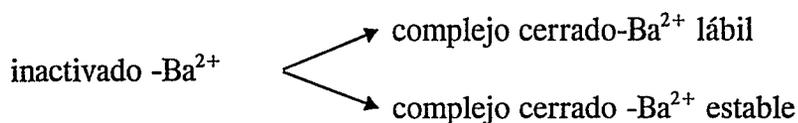
1.3.2. Modelo de unión de Ba^{2+} al estado inactivado tipo C.

El proceso de unión al estado inactivado tipo C es un proceso irreversible y sin embargo existe siempre una fracción de corriente no bloqueada. Como se explicó en la sección de resultado una forma de entender esta contradicción es considerar el siguiente esquema cinético, teniendo en cuenta que la medición del bloqueo se hace luego de repolarizar la membrana a -100 mV y por lo tanto de llevar a los canales al estado cerrado:

i.- entrada a 0 mV:



ii.- salida a -100 mV



Un esquema se muestra en la figura 46. Etapa i: la constricción de la boca externa del poro hace muy difícil el paso de Ba²⁺, sin embargo este cambio conformacional no lo impide, uniéndose el bloqueador a un sitio. Etapa ii: cuando se repolariza la membrana el equilibrio se desplaza a la derecha, y como se mostró experimentalmente (Fig. 23), una fracción del Ba²⁺ deja el canal muy rápidamente y otra lo hace siguiendo la cinética de salida del componente lento de los canales cerrados (Hurst y col., 1995). El modelo predice que la ocupación del sitio en el canal inactivado será completa y que la constante de tiempo del bloqueo decrece a medida que aumenta la concentración del Ba²⁺ (Fig. 27). Sin embargo, luego de la repolarización, el modelo predice dos componentes de salida. Puesto que experimentalmente es necesario repolarizar la membrana a -100 mV, para estudiar el bloqueo de los canales inactivados, la de entrada del Ba²⁺ al sitio es descrita por una exponencial más una corriente residual aparente. Esta fracción que no se bloquea corresponde a la fracción de Ba²⁺ que pasa al sitio lábil, y que se lava instantáneamente al repolarizar.

La constante de disociación del Ba²⁺ al canal en estado cerrado es $9 \cdot 10^{-3}$ M. El cambio conformacional al estado inactivado produce un aumento de la afinidad del canal por el Ba²⁺, ya que la Kd en este caso es mucho menor que $7.9 \cdot 10^{-3}$ M. Este

aumento en la afinidad del canal por el bario ocurre también para el K^+ , ya que su entrada y salida al canal inactivado es muy lenta. Para que el Ba^{2+} no pase hacia el lado intracelular debe existir una segunda barrera de energía que lo impida. Los estudios de conductancia de Na^+ en el estado inactivado revelaron que el potasio aplicado externamente la bloquea (Starkus y col., 1997). Es posible que exista un sitio de potasio de muy alta afinidad y que su ocupación impida el flujo de Na^+ . Este K^+ podría también obstruir la salida del Ba^{2+} hacia la solución intracelular.

El sitio estable de unión a Ba^{2+} en el canal cerrado se localiza en el 25 % del campo eléctrico (distancia eléctrica aparente $\delta = 0,25$) (Hurst y col., 1995) y el ácido aspártico 447 formaría parte o estaría en las vecindades de este sitio (Hurst y col., 1996). El Ba^{2+} podría estar entonces estar uniéndose fuertemente al filtro de selectividad del canal, del cual el residuo 447 forma parte. Este filtro ha sido ubicado a 0,5 nm de la solución extracelular (Ranganathan y col., 1996). Si no sólo la barrera para la entrada del Ba^{2+} se movió fuera del campo eléctrico, sino que también lo hizo el sitio, esto significaría un cambio de posición de al menos 0,5 nm.

Nuestros resultado, así como la unión de potasio al estado inactivado tipo C (Levy y Deutsh, 1996b), se oponen a la idea de un colapso total de la boca. Por otra parte, los resultados de cambio de la permeabilidad del canal en estado inactivado tipo C nos mostraron que el potasio no puede pasar a través del canal pero si lo hacen iones más pequeños como el Na^+ o Li^+ . Tomando todos estos antecedentes podemos pensar que ocurre una aproximación de las subunidades, la cual lleva a un reordenamiento de

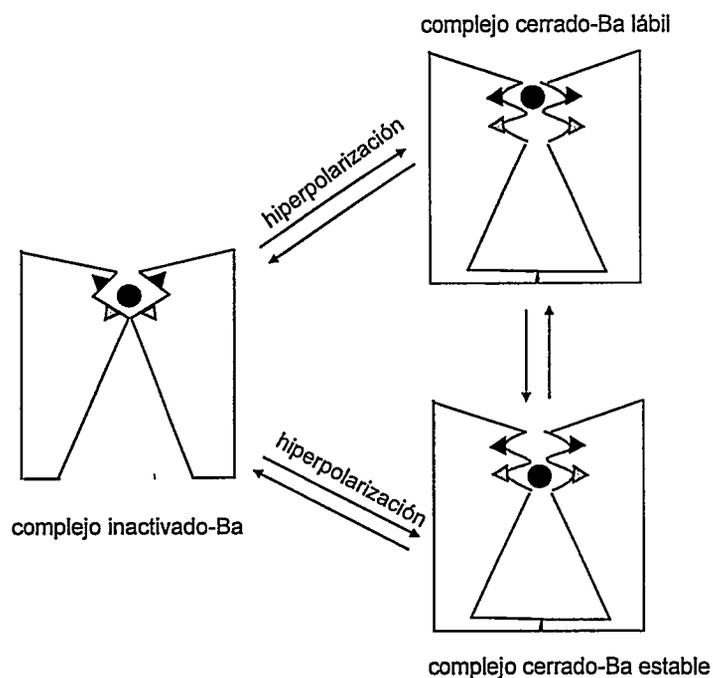


Figura 46. Esquema que ilustra el cambio conformacional en el poro del canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ cuando entra al estado inactivado tipo C. El Ba^{2+} se une a su sitio en el estado inactivado (a 0 mV) y mide la fracción de canales bloqueados luego de repolarizar la membrana (a -100 mV). Al repolarizar el Ba^{2+} se distribuye entre los dos sitios presentes en el canal cerrado: un sitio lábil, desde donde sale rápidamente, y un sitio estable, desde donde se libera lentamente. En nuestros experimentos sólo podemos discriminar la salida desde el complejo cerrado- Ba^{2+} .

los residuos del poro, lo que a su vez altera la permeabilidad del canal. Sin embargo, iones que no son permeable en el estado inactivado, como el K^+ y Ba^{2+} pueden acceder a un sitio en un proceso muy lento. Al parecer las barreras energéticas de acceso al poro del canal de los iones de mayor tamaño (K^+ y Ba^{2+}) se han modificado dificultando la entrada y salida, en tanto que las barreras para los iones de menor tamaño (Na^+ y Li^+) no impiden su paso a través del canal.

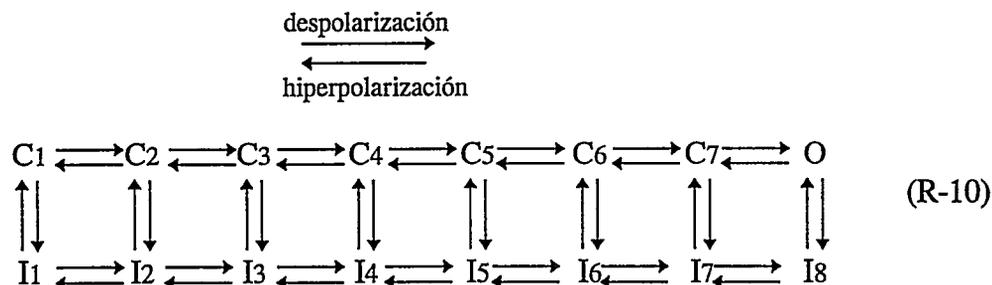
2. Interacciones entre dominios de la proteína durante la inactivación tipo C.

La inactivación tipo C conlleva un reordenamiento de la boca externa del canal como fue discutido en la sección anterior, y por lo tanto podrían modificarse las interacciones entre los distintos dominios de la proteína. Este tema fue abordado por

Olcese y col. (1997) estudiando la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta. El movimiento de las cargas entre el estado cerrado y el estado abierto ha sido asociado a un movimiento del sensor del potencial, modificándose la exposición al medio interno y externo de los aminoácidos que lo conforman (Larsson y col., 1996). Cuando los canales se inactivan es posible registrar el retorno del sensor de potencial desde el estado inactivado al estado cerrado. Olcese y col. (1997) describieron una diferencia en la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta al comparar canales que se activan y canales que se recuperan de la inactivación tipo C. La aparición y desaparición de esta nueva dependencia del potencial, que sería el reflejo de un cambio conformacional del sensor (ver anexo 3), se correlaciona temporalmente con el establecimiento y la recuperación de la inactivación tipo C, respectivamente. Este resultado indica que el cambio conformacional que sufre el sensor de potencial ocurre en el marco del proceso de inactivación de tipo C, y podría deberse a un cambio en las interacciones entre dominios de la proteína. Por ejemplo entre el poro del canal, que modifica su estructura durante la inactivación, y el sensor de potencial. Esto puede ejemplificarse con un cambio de potencial de 0 mV a -60 mV, con el cual se moviliza un 90 % de la carga total cuando los canales están abiertos (curva con $H_p = -90$ mV), y sólo un 10% cuando los canales están inactivados (curva $H_p = 0$ mV) (Figura 32). Esto nos indica que necesitamos aplicar un mayor potencial eléctrico para volver el sensor al estado cerrado cuando está en la conformación que se relaciona con el estado inactivado. En

el anexo 3 se analiza la relación entre un corrimiento en la curva $Q(V)$ y la energía configuracional del canal para un modelo de dos estados. Es importante recalcar que la carga máxima que se moviliza en ambos casos es la misma y por lo tanto podemos comparar los dos procesos.

Estos resultados llevaron a proponer que existe una vía de movimiento de carga distinta a la que se sigue cuando los canales pasan de los estados cerrados al abierto, y sería una vía entre estados inactivados:



Las cargas se moverían sólo en las transiciones horizontales, siendo las transiciones verticales independientes del potencial. En respuesta a un potencial depolarizante la carga se mueve hacia la derecha, es decir hacia el estado abierto (O) o el estado I8, en tanto que en respuesta a un potencial hiperpolarizante se mueve a la izquierda, hacia los estados C1 o I1. La transición desde un estado cerrado a un estado inactivado (flechas verticales) es independiente del potencial pero resulta más favorable a medida que el canal se aproxima al estado abierto. Si esta segunda ruta para el movimiento de las cargas no existiera se esperaría la misma dependencia del potencial de las curvas $Q(V)$ cuando se va del estado cerrado al abierto que cuando se vuelve desde el inactivado al cerrado.

2.1. El bario estabiliza el sensor de potencial en el estado inactivado

Puesto que el Ba^{2+} es capaz de unirse a un sitio en el canal inactivado y formar un complejo muy estable, el Ba^{2+} podría estabilizar la conformación del sensor de potencial en este estado. Al comparar las curvas $Q(V)$ cuando los canales van desde el estado cerrado al abierto ($H_p = -90$ mV) con la de canales que van desde el estado inactivado al cerrado ($H_p = 0$ mV), en presencia de Ba^{2+} , observamos que este bloqueador sólo tiene efecto en el segundo caso. El corrimiento a potenciales más negativos de la curva $Q(V)$ en presencia de Ba^{2+} respecto al control en Ca^{2+} , para un H_p de 0 mV, nos revela una estabilización del sensor de potencial inducida por el bloqueador. Para mover el 20% de la carga en Ca^{2+} se aplica un potencial de -60 mV, en tanto que en Ba^{2+} se debe aplicar un potencial de -90 mV. Esto nos indica que existiría una tercera vía por donde puede moverse la carga de compuerta, que estaría conformada por los estados inactivados con Ba^{2+} unido, paralela a las dos vías ya propuestas.

Los resultados obtenidos en el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F no conductor y el canal *ShakerH4* $\Delta 6-46$ conductor son cualitativamente los mismos, sin embargo hay que destacar que la curva de $H_p = 0$ mV en Ca^{2+} esta más desplazada a potenciales hiperpolarizantes en el canal silvestre. En el caso de la curva en presencia de Ba^{2+} no hay diferencia notable. Esto aparece como un efecto menor del bario sobre los canales inactivados para el canal conductor al comparar los corrimientos de las curvas $H_p = 0$ mV en Ca^{2+} y Ba^{2+} (ver tabla 1).

Los estudios del bloqueo de las corrientes macroscópicas por Ba^{2+} se efectuaron con concentraciones mucho más elevadas que el estudio de las corrientes de compuerta. La unión del Ba^{2+} al canal es irreversible y por lo tanto no podemos hablar de una constante de disociación, pero no esperamos observar bloqueo con 2 mM Ba^{2+} (concentración usada para el registro de corrientes de compuerta) sino en períodos muy largos. Esta diferencia en la sensibilidad podría deberse a que el efecto en las corrientes de compuerta es mediado por un sitio de unión distinto al del bloqueo de la corriente macroscópica.

Del ajuste de los datos a la suma de dos distribuciones de Boltzmann se obtuvieron los parámetros V medio (ver Tabla 1), suponiendo que la carga movilizada es la misma en todas las condiciones. Los resultados de los ajustes muestran que el Ba^{2+} afectaría principalmente al componente que moviliza menor carga (V_1). Para los canales inactivados ($H_p=0$ mV) los valores de V_1 y V_2 en Ba^{2+} son más negativos que en Ca^{2+} . En el caso de los canales cerrados ($H_p=-90$ mV) los valores de V_1 y V_2 no son modificados por el Ba^{2+} externo. Otra modificación que se observa en presencia de Ba^{2+} es el cambio en las proporciones que cada uno de los componentes de carga presenta, es decir Q . En el caso de los canales con Ba^{2+} la proporción mayoritaria la presenta el componente de menor carga y de V medio más negativo.

La interpretación de estos dos componentes de la curva $Q(V)$ ha sido la existencia de dos etapas dentro del movimiento de cargas (Bezanilla y col., 1994). La primera de ella ocurriría entre los estados cerrados más profundos a potenciales más

negativos en un proceso rápido. La segunda etapa sería el movimiento de carga entre estado cerrado más cercanos al abierto que ocurriría en un proceso lento y a potenciales más positivos. En estos términos, nuestros resultados indicarían que la energía conformacional de ambas etapas ha sido modificada por Ba^{2+} , ya que cambian ambos V medios. Hoy en día la interpretación de las dos distribuciones de Boltzmann, es controversial, puesto que estudios de la corriente de compuerta en presencia del ion permeante no presentan dos etapas en su cinética (Chen y col., 1997).

La diferencia entre las cinéticas de las corrientes de compuerta con o sin un ion permeante en el medio ha sido interpretada de dos formas. La primera posibilidad es que la transición entre el último estado cerrado y el estado abierto sea más rápida cuando el canal tiene K^+ en la vía de conducción. La segunda explicación es que el componente lento de la cinética off de las corrientes de compuerta sea el reflejo de las primeras transiciones al estado inactivado tipo C. La unión del Ba^{2+} al estado cerrado modifica la cinética de la corriente off de compuerta (anexo 1, figura 47), como si evitase que el canal comenzara la transición al estado inactivado. Sin embargo el Ba^{2+} no modifica la posición de la curva $Q(V)$. Como fue descrito por Olcese y col. (1997) y comprobado en esta tesis, cuando los canales están inactivados se observa un corrimiento en la posición de la curva de cargas en el eje del potencial. Si el componente lento fuese producto de que la transición $I \rightarrow O$ fuese una etapa limitante en el retorno de las cargas de compuerta, esperaríamos que al aplicar Ba^{2+} a canales inactivados la curva $Q(V)$ presentara la misma posición que la de canales cerrado con

Ba²⁺. Nosotros mostramos que esto no ocurre y por lo tanto podríamos descartar la segunda explicación del efecto de los iones en la cinética de las corrientes de compuerta.

2.2. El sitio de Ba²⁺ en el canal inactivado podría ser el mismo sitio que en el canal cerrado.

A través del estudio de las modificaciones de la cinética de las corrientes de compuerta en presencia de Ba²⁺, Hurst y col. (1996) propusieron que el residuo 447 podría formar parte del sitio de unión del canal cerrado. En condiciones controladas, es decir en presencia de Ca²⁺, el retorno de las cargas de compuerta tiene dos fases, una rápida y una lenta, manifestándose la segunda solamente cuando el pulso de potencial es mayor que -40 mV. Cuando el canal cerrado en presencia de Ba²⁺, la cinética de retorno de la carga no cambia con el potencial, observándose sólo la fase rápida (ver figura 30). Al mutar el residuo 447, que en el canal silvestre es ocupado por un ácido aspártico a una asparagina, se obtuvo un canal en el cual el bario no tiene ningún efecto, es decir están presentes las dos fases en la cinética de retorno de las cargas de compuerta. No es extraño pensar en este amino ácido como parte del sitio de unión de Ba²⁺ al canal cerrado, puesto que este residuo forma parte del filtro de selectividad del canal. El filtro de selectividad podría ser alcanzado desde el lado extracelular aún cuando el canal está cerrado, ya que la puerta o "gate" del canal se ubica hacia el lado intracelular (Armstrong y Taylor, 1980). Se propuso que este sitio correspondería al

sitio estable descrito a partir de las corrientes macroscópicas, cuya localización en el campo eléctrico es a una distancia eléctrica de 25%.

Los experimentos realizados en este mutante con Ba^{2+} externo en canales inactivados nos permiten pensar que el sitio de unión en este estado sería el mismo que en el canal cerrado. El efecto del Ba^{2+} externo sobre los canales inactivados es el corrimiento a potenciales negativos de la curva $Q(V)$. En el mutante D447N este corrimiento no se observa (ver figura 38), indicándonos que el Ba^{2+} posiblemente no se unió a este canal en estado inactivado así como no es capaz de unirse al canal en estado cerrado.

Nuestros resultados del efecto del Ba^{2+} a nivel de las corrientes macroscópicas, nos indicaron que posiblemente una fracción bario sale desde el segundo sitio en el canal cerrado, independiente de si se unió al estado cerrado o al estado inactivado. El resultado del estudio de las corrientes de compuertas que indica que el aminoácido 447 participa tanto en la unión del Ba^{2+} al canal cerrado como en la unión al canal inactivado, concuerda con el modelo planteado en la figura 45.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, pensamos que los efectos de Ba^{2+} a nivel de corriente macroscópica y de corriente de compuerta son el resultado de la unión a diferentes sitios. Hay que destacar que la curva control de los canales inactivados, es decir en Ca^{2+} con un $H_p = 0$ mV, es muy similar a la curva de los canales inactivados con Ba^{2+} del mutante W434F (comparar figuras 32 y 38). Esto podría ser interpretado como que en el mutante D447N el Ba^{2+} no produce un

corrimiento a potenciales más negativos por que el sensor esta ya estabilizado al máximo en presencia de calcio, y la unión del bario no puede aumentar esta estabilidad. Puesto que este mutante no conduce no es posible verificar la unión del bario al canal en estado inactivado, y por lo tanto no podemos descartar esta posibilidad, aunque los antecedentes de unión al estado cerrado y nuestros propios resultados de bloqueo del estado inactivado nos hacen pensar que con esta mutación hemos alterado las inmediaciones o el sitio de unión del Ba^{2+} .

El ajuste de los datos de las curvas $Q(V)$ (ver tabla 1) indica que el Ba^{2+} tendría un pequeño efecto. En este mutante ambos componentes, $V1$ y $V2$, son modificados, observándose un pequeño corrimiento a potenciales más negativos. No se observa un cambio de la proporción de los dos componentes.

3. La inactivación tipo C es un sólo proceso molecular?

La inactivación lenta, llamada de tipo C, fue descrita en un principio como un tipo de inactivación que era afectada por la mutación del residuo 463 en el segmento transmembrana S6 (Hoshi y col., 1991). Luego se determinó que mutaciones en la región del poro, en particular en el residuo en posición 449 afectan la cinética de inactivación (López-Barneo y col., 1993). Un caso muy particular entre los mutantes de la región del poro lo constituye el mutante *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F, que produce un canal no conductor (Perozo y col., 1993). Se ha postulado que este mutante sufre un proceso de inactivación extremadamente rápido, registrándose en parches de

membranas unas pocas aperturas de canales únicos (probabilidad de apertura $< 10^{-5}$) (Yang y col., 1997). Probablemente la mayoría de los canales pasen directamente a un estado inactivado desde un estado cerrado.

El corrimiento de la curva $Q(V)$ al comparar canales que estaban en $H_p = -90$ mV con canales que estaban en $H_p = 0$ mV para *ShakerH4* $\Delta 6-46$ ha sido explicado por distintas posiciones del sensor de potencial respecto al campo eléctrico. Las cargas de compuerta se moverían por distintas vías cuando el canal está en estado cerrado o en estado inactivado tipo C (ver introducción sección 3.2.4). Resulta muy difícil entender que en el caso de W434F, un canal que esta prácticamente todo el tiempo en estado inactivado tipo C, exista también este corrimiento. Esperaríamos que la curva $Q(V)$ de este canal, para cualquier potencial de mantención, estuviese en la posición correspondiente al movimiento de cargas por la vía de los estados inactivados.

Una posible explicación para esta paradoja sería la existencia de dos tipos de inactivación de tipo C: la inactivación tipo P y inactivación tipo S6. La primera relacionada a los efectos de las mutaciones en el poro y la segunda relacionada a los efectos de las mutaciones en el segmento S6. De Biasi y col. (1993) propusieron la existencia de la inactivación de tipo P (ver la introducción sección 3.2.1), y llamaron la atención sobre una posible confusión de fenómenos. Si el canal W434F estuviese constantemente inactivado tipo P, la inactivación tipo S6 podría dar cuenta del corrimiento en la curva $Q(V)$.

Analizando el corrimiento de la curva $Q(V)$ con $H_p = 0$ mV respecto a la

curva con $H_p = -90$ mV en mutantes del canal *Shaker* intentamos diferenciar estos dos posibles tipos de inactivación.

3.1. *Mutantes que no se inactivan presentan un corrimiento en la curva Q(V).*

La comparación de la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta podría permitirnos discriminar entre los dos tipos de inactivación si es que ellos existen. El corrimiento de la curva $Q(V)$ a potenciales negativos cuando se mide el retorno del sensor desde el estado inactivado en relación a la curva que se mide el movimiento desde el estado cerrado fue correlacionado con el proceso de inactivación (Olcese y col., 1997). Para explicar el hecho que el corrimiento también ocurre en W434F, el cual entraría instantáneamente en el estado inactivado al despolarizar la membrana, se propuso que este mutante sufriría la inactivación de tipo S6. El proceso afectado por la mutación sería la inactivación de tipo P. De este modo el corrimiento de la curva $Q(V)$ se relacionaría con la inactivación de tipo S6.

Un mutante puntual de la región carboxilo terminal, que por lo tanto correspondería a un mutante de la inactivación de tipo S6, es *ShakerH4 Δ6-46 I470C*. Este canal no presenta decaimiento de la corriente iónica cuando se mantiene un pulso despolarizante, es decir no tiene inactivación (Holgrem y col., 1997). La descripción de un mutante puntual en la región carboxilo terminal, que no presenta inactivación resulta difícil de conciliar con la idea de dos tipos de inactivación actuando en forma independiente. Aún más sorprendente fue la observación de un corrimiento de la curva

Q(V) al variar H_p . El doble mutante T449V I470C, que en teoría tendría afectado los dos procesos de inactivación, también presenta el cambio en la dependencia del potencial (fig. 43). Incluso, en este caso, el cambio de posición en el eje del potencial es similar al que presenta el canal W434F.

Resulta muy difícil explicar estos resultados en términos de dos tipos de inactivación, no siendo posible como se había pensado, distinguirlos. Más aún cuando el grado de corrimiento es prácticamente el mismo para un canal que está siempre inactivado (W434F) y otro que no tiene decaimiento de la corriente iónica (T449V I470C).

Al observar los registros de corriente iónica de los mutantes T449V I470C (fig. 41) e I470C (Fig. 39) observamos además de la fase rápida de activación hay una fase de activación lenta (comparar figuras 14, 39 y 41). En el caso del canal silvestre la activación ocurre en pocos milisegundos. Estas dos mutaciones, además de producir un canal sin inactivación, inducen la aparición de una fase lenta en la activación.

Podríamos llegar a pensar que en estos canales la conformación "inactivada" del sensor de potencial, que resulta en el corrimiento de las curvas Q(V), no se asocia a un estado no conductor. El mutante I470C tiene la particularidad de poder alojar bloqueadores de gran tamaño como el C10 (un amonio cuaternario con una rama de diez carbonos) en el estado cerrado, casi sin modificar la transición al estado abierto. Se postuló la modificación de la cavidad o vestíbulo interno sin alteración de la puerta o "gate" de activación. Es posible que esta modificación afecte de algún modo la

constricción del poro del canal, y que en este caso el cambio conformacional no impida el flujo iónico. Esta modificación en el poro del canal no afecta el cambio conformacional que sufre el sensor de potencial en respuesta a potenciales despolarizantes prolongados, estando los dos procesos desacoplados en este mutante.

Se planteó anteriormente, que un cambio en la interacción entre el sensor de potencial y el poro del canal, debido a la modificación que sufre la vía de conducción durante la inactivación, podría ser la explicación para el cambio en la posición de la curva $Q(V)$. Los resultados obtenidos con estos mutantes que no se inactivan indicarían que el proceso podría ser el contrario. El cambio conformacional que sufre el sensor de potencial en respuesta a potenciales despolarizantes prolongados podría influir en la conformación de la vía de conducción. En el caso de los mutantes sin inactivación se habría interrumpido el proceso a nivel del acoplamiento del sensor de potencial con la vía de conducción o bien la etapa del cambio conformacional de la vía de conducción.

Todas las mutaciones que se emplearon para estudiar el efecto del Ba^{2+} en la dependencia del potencial del movimiento de las cargas de compuerta alteran la inactivación, y todas ellas afectan la dependencia de la curva $Q(V)$ sólo con un $H_p = 0$ mV. En ningún caso hemos observado una modificación de la curva con un $H_p = -90$ mV. Por lo que podemos relacionar este cambio con el proceso de inactivación lenta, sin embargo no podemos definir claramente cuales son las relaciones entre el grado de separación entre las curvas $Q(V)$ en el eje del potencial de los canales cerrados y de los

canales inactivados y el efecto de la mutación, lo que nos indica que el proceso y los cambios conformacionales que están ocurriendo son muy complejos.

ANEXO 1

Bloqueo por bario externo de los canales ShakerH4 Δ6-46 en estado cerrado.

El bloqueo de los canales de K^+ *ShakerH4* Δ6-46 en el estado cerrado, fue estudiado en detalle por Hurst y col. (1995, 1996, y 1997); estos resultados serán descritos brevemente así como la determinación del posible sitio de unión, puesto que se compararan con resultados obtenidos en el estado inactivado.

El bloqueo de los canales de K^+ *ShakerH4* Δ6-46 en el estado cerrado es un proceso que ocurre en dos etapas, un muy rápida, casi instantánea y otra más lenta (Hurst y col., 1995). La etapa de bloqueo lenta se caracteriza por una cinética de decaimiento exponencial con una constante de tiempo τ de 160 s, para una concentración de Ba^{2+} externa de 20 mM, mientras que la recuperación del canal bloqueado sigue una función monoexponencial con una constante de tiempo τ de 180 s (Fig. 47). Se propuso la existencia de dos sitios de unión consecutivos para Ba^{2+} en el canal, siguiendo un esquema cinético como se muestra a continuación

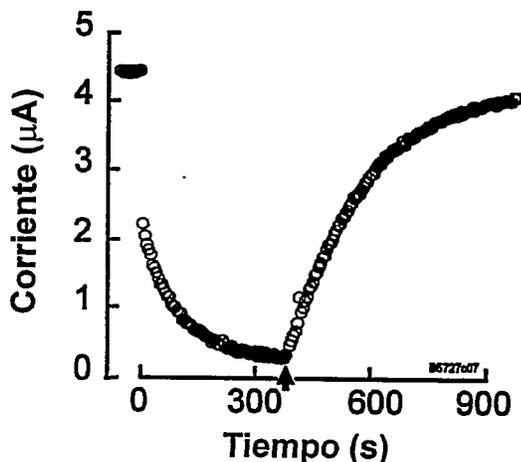
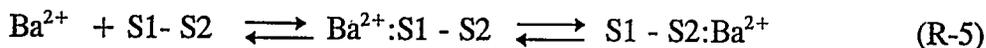


Figura 47. Cinética de entrada y de salida de Ba^{2+} externo al canal en el estado cerrado.

La corriente no bloqueada fue seguida con pulsos de 8 ms a 30 mV, repetidos cada 5 s, desde un Hp de -100 mV. Los símbolos muestran la corriente al final de cada pulso. Ba^{2+} 20 mM fue agregado a tiempo 0 y lavado cuando lo indica la flecha. (figura tomada de Hurst y col., 1997)

Para determinar la localización en el campo eléctrico de cada uno de ellos se estudiaron las constantes de disociación a cada uno de los sitios: el primer sitio se encuentra en un 14 % del campo eléctrico en tanto que el segundo sitio se encuentra en un 25 % del campo eléctrico.

Puesto que el residuo en posición 449 participa en la unión del TEA (Heginbotham y MacKinnon, 1992) se estudio el efecto de mutaciones puntuales de esa posición sobre la unión de Ba^{2+} (Hurst y col., 1996). La mutación T449Y enlentece la unión del bario al segundo sitio, sin afectar la unión al primer sitio, mientras que otras dos mutantes, T449A y T449V no tuvieron ningún efecto. Por otra parte el estudio de las corrientes de compuerta en presencia de Ba^{2+} externo permitió determinar que el residuo en posición 447, ubicado en el poro del canal, es o forma parte del sitio de unión del bario. Se observó un efecto del Ba^{2+} en la cinética de retorno de la carga del canal *ShakerH4* Δ W434F (Hurst y col., 1997), que es un canal no conductor que se comporta como el canal silvestre en cuanto a las corrientes de compuerta (Perozo y col., 1993). Normalmente la cinética de retorno de la carga (Q_{off}), que se observa al finalizar un pulso despolarizante (V_{test}) es rápida cuando el V_{test} es < -40 mV, y se hace lenta cuando el V_{test} empleado es mayor. En presencia de Ba^{2+} externo la cinética de retorno de la carga es rápida independiente del V_{test} empleado (Fig. 48A). Aunque en un medio con Ca^{2+} el mutante D447N, en el cual ha neutralizado una carga en el poro, muestra las dos etapas descritas en la cinética de Q_{off} del canal silvestre, el Ba^{2+} no es capaz modificar dicha cinética (Fig. 48B) (Hurst y col., 1996). Este resultado permitió proponer que el residuo 447 es o forma parte del sitio de unión del

Ba^{2+} en el estado cerrado. En resumen se demostró que, como fue propuesto por Armstrong y Taylor (1980) en la descripción original, la unión del bario al canal esta mediada, al menos, por un residuo de carga negativa ubicado en el poro, que sería el aminoácido D447 y por otra parte que el residuo en posición 449 podría ser parte de la barrera de energía que debe superar el Ba^{2+} para alcanzar el segundo sitio de unión (Hurst y col., 1996).

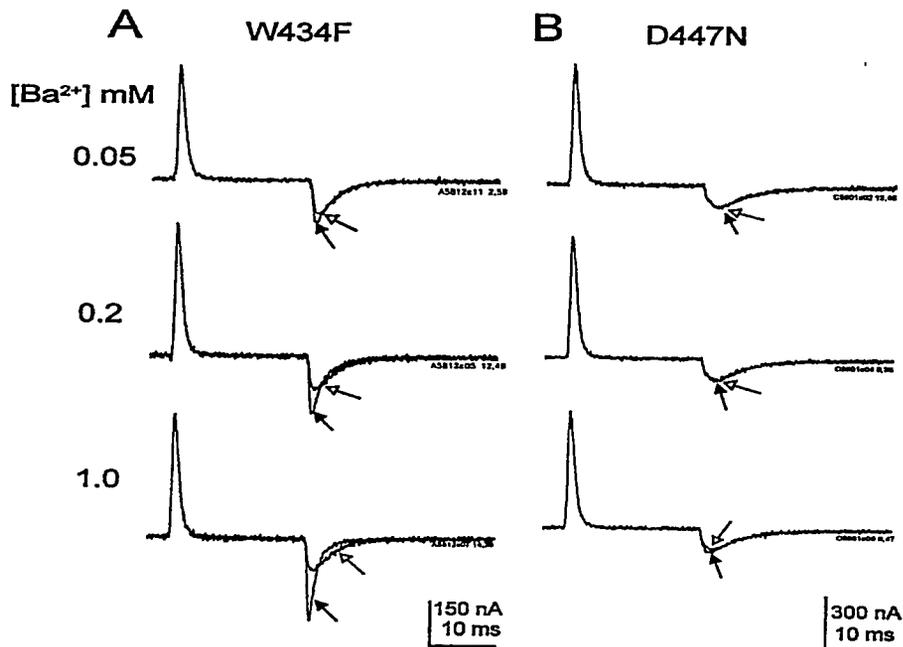


Figura 48. La mutación D447N reduce la capacidad del Ba^{2+} de acelerar el retorno de las corrientes de compuerta.

(A). Se muestran las corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ W434F en presencia de Ca^{2+} (control) o Ba^{2+} externo. Cada panel muestra el registro de la corriente de compuerta en condiciones control (flecha blanca), con Ba^{2+} externo en la concentración indicada (flecha negra). La corriente de compuerta fue medida con pulsos despolarizantes a 30 mV, desde un $H_p = -90$ mV. (B). En las mismas condiciones se muestran las corrientes de compuerta de *ShakerH4* $\Delta 6-46$ D447N.

ANEXO 2

1. *Modelo de inactivación concertado*

En un modelo de acción concertada de las subunidades cada subunidad contribuye en forma equivalente a la transición y la constante cinética de inactivación (k_i) del canal es

$$k_i = v \exp \left(- \left(n \Delta G_1^\ddagger + (4-n) \Delta G_2^\ddagger \right) / k_b T \right) \quad (\text{ec.12})$$

donde v es la frecuencia de intento (10^{12} s^{-1}), n el número de subunidades de tipo 1 o rápidas, k_b la constante de Boltzmann, T la temperatura en grados Kelvin, y

$$\Delta G_1^\ddagger = (-k_b T \ln(k_R/v)) / 4 \quad (\text{ec.13})$$

$$\Delta G_2^\ddagger = (-k_b T \ln(k_L/v)) / 4 \quad (\text{ec.14})$$

donde k_R es la constante de velocidad de inactivación del canal rápido. Si consideramos que la constante de recuperación es despreciable comparada con la inactivación entonces la constante de tiempo del proceso de inactivación es $\tau = 1/k_R$.

Del mismo modo k_L es la constante de velocidad de inactivación del canal lento y $\tau_L = 1/k_L$.

En el caso de un dímero:

$$k_i = v \exp \left(- \left(2 \Delta G_1^\ddagger + 2 \Delta G_2^\ddagger \right) / k_b T \right) \quad (\text{ec. 15})$$

2. Modelo de inactivación con subunidades independientes..

En el caso de subunidades actuando en forma independiente entre ellas, donde basta que una se inactive para que la corriente cese, la cinética de inactivación de un canal es la suma de las constantes cinéticas de cada subunidad

$$k_i = (n k_R + (4-n) k_L) / 4 \quad (\text{ec. 16})$$

en el caso de un dímero

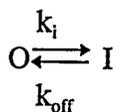
$$k_i = (k_R + k_L) / 2 \quad (\text{ec. 17})$$

suponiendo que la recuperación de la inactivación es despreciable

$$1/\tau = (1/\tau_R + 1/\tau_L) / 2 \quad (\text{ec. 18})$$

3. Dímero WT- T449Y.

El pedestal de corriente no inactivada en los casos del canal silvestre y del canal mutante T449Y no es despreciable, y por lo tanto la aproximación $1/\tau = k_i$ introduce un error. Considerando la transición:



donde la constante de tiempo es $\tau = 1 / (k_i + k_{\text{off}})$ y el pedestal de corriente que no se inactiva es la probabilidad del estado O, $P_o = k_{\text{off}} / (k_i + k_{\text{off}})$, podemos obtener el valor de k_i , donde $k_i = 1/\tau * (1-P_o)$.

En el caso de los canales formados por únicamente por subunidades silvestre o por subunidades T449Y se calculó k_i y empleando las ecuaciones 12 y 17 obtuvieron los

valores de k_i esperados para el dímero WT-T449Y. En el caso del modelo concertado el valor de predicho para esta constante es de 0.108 s^{-1} en tanto que para el modelo de independencia de subunidades es 0.136 s^{-1} . Experimentalmente determinamos el valor de P_o y de la constante de tiempo de inactivación para el dímero, con estos valores calculamos la k_i , obteniendo un valor de 0.162 s^{-1} . Este valor es mayor al esperado según los modelos simples aquí expuestos.

ANEXO 3

(basado en Lecar y col., 1975)

Si consideramos un modelo simple de transición entre dos estados 1 y 2 la diferencia de energía libre entre dos estados conformacionales (ΔG) resulta de la suma de una energía configuracional intrínseca (ΔG_{conf}) más la energía eléctrica (ΔG_{elec}) que es necesario aplicar para ir de un estado a otro.

$$\Delta G = \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{elec}} \quad (\text{ec. 19})$$

y

$$\Delta G_{\text{elec}} = a V \quad (\text{ec. 20})$$

donde V es el potencial de membrana y "a" es una constante.

Cuando la probabilidad de estar en el estado 1 es igual a la probabilidad de estar en el estado 2, la energía eléctrica y la configuracional se cancelan

$$-\Delta G_{\text{conf}} = \Delta G_{\text{elec}} = a V_{1/2} \quad (\text{ec. 21})$$

y podemos escribir la energía de transición

$$\Delta G = a V - a V_{1/2} \quad (\text{ec. 22})$$

si el número total de canales es N , y el número de canales en el estado 1 es n_1 y en el estado 2 es n_2 , podemos decir que a cualquier potencial

$$n_1/n_2 = \exp(-\Delta G / kT) \quad (\text{ec. 23})$$

y la fracción de canales en estado 1 es

$$f(V) = n1/N = \frac{1}{1 + \exp [(aV - aV_{1/2}) / kT]} \quad (\text{ec. 24})$$

en el caso de la curva $Q(V)$, la posición de la curva en el eje del potencial es descrita por la ecuación de Boltzmann

$$Q(V) = \frac{Q_{\max}}{1 + \exp [(-zeV + zeV_{1/2}) / kT]} \quad (\text{ec. 25})$$

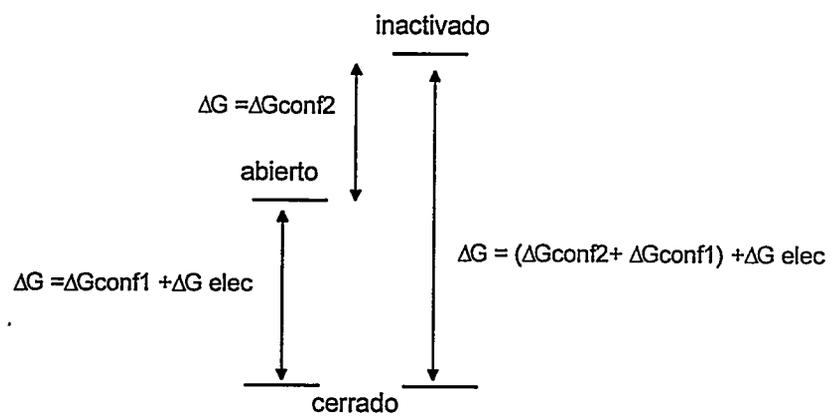
donde $a = -ze$, z es la carga movilizada y e la carga elemental, podemos entonces decir que

$$\Delta G_{\text{conf}} = -zeV_{1/2} \quad (\text{ec. 26})$$

$$\Delta G_{\text{elec}} = -zeV \quad (\text{ec. 27})$$

En nuestro caso al comparar la curva $Q(V)$ para la transición del sensor de potencial desde el estado abierto al estado cerrado con la transición desde el estado inactivado al cerrado observamos que sólo se modifica el parámetro $V_{1/2}$ y no es necesario modificar el parámetro z (ver figura 32). Por lo tanto la diferencia entre estados curvas es la energía configuracional, cambio que ocurriría cuando el sensor pasa desde la conformación que tiene en el estado abierto a la que tiene en el estado inactivado.

En un esquema de niveles de energía:



BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, C. M. y Bezanilla, F. 1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242: 459-461.
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F., y Rojas, E. 1973. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol* 62: 375-391.
- Armstrong, C.M., Swenson, R.P. y Taylor, S.R.. 1982. Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen. Physiol.* 80: 663-682.
- Armstrong, C.M., y Taylor, S.R. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30: 473-488.
- Baukrowitz, T. y Yellen, G. 1995. Modulation of K^+ current by frequency and external $[K^+]$: A tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15: 951-960.
- Baukrowitz, T. y Yellen, G. 1996. Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K^+ channel. *Science*. 271: 653-665.
- Bezanilla, F. y Armstrong, C.M. 1977. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70: 549-566.
- Bezanilla, F., Perozo, E. y Stefani, E. 1994. Gating of *Shaker* K^+ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 66: 1011-1021.
- Bezanilla, F. y Stefani, E. 1994. Voltage-dependent gating of ionic channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 819-46.
- Chen, F.S.P., Steele, D. y Fefida, D. 1997. Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K^+ channel deactivation. *J. Gen. Physiol.* 110: 87-100.
- Choi, K.L., Aldrich, R.W. y Yellen, G. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5092-5095.

- De Biasi, M., Hartmann, H.A., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Brown A.M. y Kirsch, G.E. 1993. Inactivation determined by a single site in K⁺ pores. *Pflügers Arch.* **422**: 354-363.
- Gomez-Lagunas, F. y Armstrong, C.M. 1994. The relation between ion permeation and recovery from inactivation of *Shaker*B K⁺ channels. *Biophys. J.* **67**: 1806-1815.
- Gomez-Lagunas, F. y Armstrong, C.M. 1995. Inactivation in *Shaker*B K⁺ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys. J.* **68**: 89-95.
- Grissmer, S. y Cahalan, M. 1989. TEA prevents inactivation while blocking open K⁺ channels in human T lymphocytes. *Biophys. J.* **55**: 203-206.
- Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Joho, R.H. y Brown, A.M. 1991. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science.* **251**: 942-944.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. y MacKinnon, R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**: 1061-1067.
- Heginbotham, L. y MacKinnon, R. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron.* **8**: 483-491.
- Hidalgo, P. y MacKinnon, R. 1995. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with peptide inhibitor. *Science.* **268**: 307-310.
- Hille, B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. Edited by B. Hille. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. Second edition.
- Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**: 500-544.
- Holgrem, M., Smith, P.L. y Yellen, G. 1997. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels. Evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J. Gen. Physiol.* **109**: 527-535.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., y Aldrich, R.W. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. y Aldrich, R.W.. 1991. Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron.* **7**:547-556.

- Hurst, R.S., Busch, A.E., Kavanaugh, M.P., Osborne, P.B., North, R.A. y Adelman, J.P. **1991**. Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Molec. Pharmacol.* **40**: 572-576.
- Hurst, R.S., Latorre, R., Toro, L. y Stefani, E. **1995**. External barium block of *Shaker* potassium channels: evidence for two binding sites. *J. Gen. Physiol.* **106**: 1069-1087.
- Hurst, R.S., Roux, M.J., Toro, L. y Stefani, E. **1997**. External barium influences the gating charge movement of *Shaker* potassium channels. *Biophys. J.* **72**: 77-84.
- Hurst, R.S., Toro, L. y Stefani, E. **1996**. Amino acid residues involved in external barium block of *Shaker* potassium channels. *FEBS Lett.* **388**: 59-65.
- Isacoff, E.Y., Jan, L.Y. y Jan, Y.N. **1990**. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* **345**: 530-534.
- Jegla, T. y Salkoff, L. **1994**. Molecular evolution of K⁺ channels in primitive eukaryotes. *Soc Gen Physiol Ser.* **49**: 213-222.
- Kavanaugh, M.P., Hurst, R.S., Yakel, J., Varmun, M.D., Adelman, J.P. y North, R.A. **1992**. Multiple subunits of a voltage-dependent potassium channel contribute to the binding site of tetraethylammonium. *Neuron.* **8**: 493-497.
- Keynes, R.D. y Rojas, E. **1974**. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol.* **239**: 393-434.
- Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Hartman H.A., Tagliatela, M., de Biasi, M., Brown, A.M. y Joho R.H. **1992**. Differences between the deep pores of K⁺ channels determined by an interacting pair of non polar amino acids. *Neuron.* **8**: 499-505.
- Kirsch, G.E., Pascual, J. M., and Shieh, C-C. **1995**. Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-dependent potassium channels. *Biophys. J.* **68**: 1804-1813.
- Labarca, P. y MacKinnon, R. **1993**. Permeant ions influence the rate of slow inactivation in *Shaker* K⁺ channels. *Biophys. J.* **61**:A378 (Abstract).
- Larsson, H.P., Baker, O.S., Dhillon, D.S., y Isacoff, E.Y. **1996**. Transmembrane movement of the *Shaker* K⁺ channel S4. *Neuron* **16**: 387-397.

Latorre, R. y Labarca P. **1996**. Potassium channels: diversity, assembly, and differential expression. *En* Evans, J.M.; Hamilton, T.C.; Logman, S.D. y Geoffrey, S. (eds), Potassium channel and their modulators: from synthesis to clinical experience. Taylor and Francis incorporated. England.

Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P. y Alvarez, O. **1989**. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 385-99.

Lecar, H., Ehrenstein, G. y Latorre, R. **1975**. Mechanism for channel gating in excitable bilayers. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* **264**: 304-313.

Levy, D.I. y Deutsch, C. **1996a**. Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys.J.* **70**: 798-805.

Levy, D.I. y Deutsch, C. **1996b**. A voltage-dependent role of K^+ in recovery from C-type inactivation. *Biophys.J.* **71**: 3157-3166.

Liman, E.R. Hess, P., Weaver, F. y Koren, G. **1991**. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K^+ channel. *Nature* **353**: 752-56.

Liu, Y., Jurman, M.E. y Yellen, G. **1996**. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K^+ channel during gating. *Neuron* **16**:859-867.

López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.F. y Aldrich, R.W.. **1993**. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors and Channels* **1**:61-71.

MacKinnon, R. **1991**. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature.* **350**: 232-235.

MacKinnon, R. **1995**. Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron.* **14**: 889-892.

MacKinnon, R., Aldrich, R.W. y Lee, A.W. **1993**. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* **262**: 757-759.

MacKinnon, R. y Miller, C. **1989**. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science.* **245**: 1382-1385.

MacKinnon, R. y Yellen, G. **1990**. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated potassium channels. *Science.* **250**: 276-279.

- Marom, S. y Levitan, I.B. 1994. State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel. *Biophys. J.* 67: 579-589.
- McCormack, K., Lin, L., Iverson, I.E., Tanouye, M.A. y Sigworth, F.J. 1992. Tandem linkage of *Shaker* K⁺ channel subunits does not ensure the stoichiometry of expressed channels. *Biophys. J.* 63: 1406-1411.
- Molina, A., Castellano, A.G. y López-Barneo, J. 1997. Pore mutations in *Shaker* K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J. Physiol.* 499:361-367.
- Moore, W.J. 1972. Physical chemistry 4th ed., p. 372. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Murrel-Lagnado, R.D. y Aldrich R.W. 1993. Interactions of amino terminal domains of *Shaker*H4 Δ K⁺ channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J. Gen. Physiol.* 102: 949-975.
- Nguyen, A., Kath, J.C., Hanson, D.C., Biggers, M.S., Canniff, P.C., Donovan, C.B., Mather, R.J., Bruns, M.J., Rauer, H., Aiyar, J., Lepple-Wienhues, A., Gutman, G.A., Grismmer, S., Cahalan M.D. y Chandy, K.G. 1996. Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Molec. Pharmacol.* 50: 1672-1679.
- Noda M., Shimizu S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamina., M., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida. Y., Miyata, T. y Numa. S. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-7.
- Ogielska, E.M. y Aldrich, R.W. 1997. A single amino acid substitution in the S6 of *Shaker* decreases potassium affinity and allows for sodium permeation in the absence of potassium. *Biophys. J.* 72: A233 (Abstrc).
- Ogielska, E.M., Zagotta, W.N., Hoshi, T., Heinemann, H.S., Habb, J. y Aldrich, R.W. 1995. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K⁺ channels. *Biophys. J.* 69: 2449-2457.
- Olcese, R., Latorre, R., Toro, L., Bezanilla, F. y Stefani, E. 1997. Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in *Shaker* K⁺ channels . *J.Gen. Physiol.* 110: 1-12.

- Panyi, G., Sheng, Z., Tu, L. y Deutsch, C. 1995. C-type inactivation of a voltage-gated K^+ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* **68**: 896-903.
- Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.H. y Jan, L.Y. 1991. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. **349**: 305-310.
- Papazian, D.M., Shao, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y. and Wainstock, D.H. 1995. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in *Shaker* K^+ channels. *Neuron* **14**: 1293-1301.
- Pardo, L.A., Heinemann, S.H., Terlau, H., Ludewing, U., Lorra, C., Pongs, O. y Stühmer, W. 1992. Extracellular K^+ specifically modulates a rat brain K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 2466-2470.
- Perozo, E., MacKinnon, R., Bezanilla F. y Stefani, E. 1993. Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in *Shaker* K^+ channels. *Neuron*. **11**: 353-358.
- Perozo E., Santacruz-Tolosa L., Stefani E., Bezanilla F. and Papazian D. 1994. S4 mutations alter gating currents of shaker K channels. *Biophys. J.* **66**: 345-54.
- Ranganathan, R., Lewis, J.H. y MacKinnon, R.. 1996. Spatial localization of the K^+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**:131-139.
- Rojas, E. y Rudy, B. 1976. Destruction of the sodium conductance inactivation by a specific protease in perfused nerve fibres from *loligo*. *J. Physiol.* **262**: 501-531.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press. Chap. 13.
- Schwarz, T.L., Temple, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. 1988. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at *Shaker* locus in *Drosophila*. *Nature*. **331**:137-142.
- Seoh, S-A. y Papazian, D.M. 1995. Mutations at D447 in the P region of *Shaker* K^+ channels accelerate C-type inactivation. *Biophys. J.* **68**: A35.
- Shieh, C-C y Kirsch G.E. 1994. Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K^+ channels. *Biophys. J.* **67**: 2316-2325.

- Slesinger., P.A., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. 1993. The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels. *Neuron*. 11: 739-749.
- Starkus, J.G., Kuschel, L., Rayner, M.D. and Heinemann, S.H. 1997. Ion conduction through C-type inactivated *Shaker* channels. *J. Gen. Physiol.* 110: 539-550.
- Stefani, E., Toro, L., Perozo, E. y Bezanilla, F. 1994. Gating of *Shaker* K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66: 996-1010.
- Swenson R.P. y Armstrong C.M. 1981. K⁺ channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺. *Nature*. 291: 427-429.
- Tagliatela, M., Toro, L. y Stefani, E. 1992. Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 61:78-82.
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.H. y Jan, L.Y. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science*. 237: 770-774.
- Toro, L., Ottolia, M., Stefani, E. y Latorre, R. 1994. Structural determinants in the interaction of *Shaker* inactivating peptide and a Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Biochemistry*. 33: 7220-7228.
- Yang, N., George, A.L.J., y Horn, R 1997. Probing the outer vestibule of a sodium channel voltage sensor. *Biophys. J.* 73: 2260-2268.
- Yang, N., y Horn, R. 1995. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15: 213-218.
- Yang, Y., Yan, Y. y Sigworth, F.J. 1997. How does the W434F mutation block current in *Shaker* potassium channels? *J. Gen. Physiol.* 109: 779-789.
- Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.-Y y Jurman, M.E.. 1994. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys.J.* 66:1068-1075.
- Yu, W., Xu, J. y Li, M. 1996. NAB domain is essential for the subunit assembly of both α - α and β - α complexes of *Shaker*-like potassium channels. *Neuron*. 16: 441-453.