

CECS

UCH - FC  
DOC - BI  
G589  
c.1

**PAPEL DEL LAZO S3-S4 Y EL SEGMENTO S3 EN LA  
ACTIVACIÓN DEL CANAL DE  $K^+$  *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  
Molecular, Celular y Neurociencias

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Carlos González León

Santiago, 8 de Septiembre del 2004.

Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre.



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

CARLOS GONZÁLEZ LEÓN

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 Molecular, Celular y Neurociencias en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Septiembre del 2004.

Director de Tesis  
Dr. Ramón Latorre

Co-Director de Tesis  
Dr. Osvaldo Álvarez

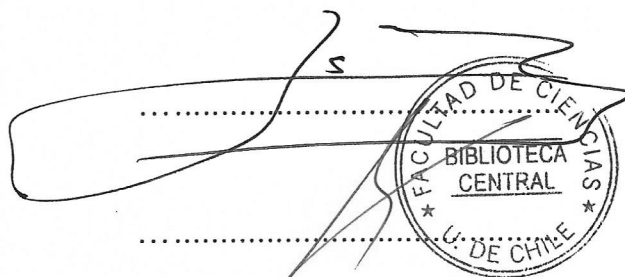
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Octavio Monasterio (P)

Dr. Manuel Kukuljan

Dr. Mario Luxoro

Dr. David Naranjo



Octavio Monasterio  
Manuel Kukuljan  
Mario Luxoro  
David Naranjo

*A la memoria de mi Madre...*

## AGRADECIMIENTOS

Esta quizás sea la parte más difícil de escribir de todo el manuscrito, primero, porque siempre se queda alguien por mencionar, y te lo echa en cara por toda la vida, segundo, porque culmina una etapa importante para cualquier profesional, rica en anécdotas y experiencias después de transitar por un largo y engorroso camino (por lo menos en mi caso) y tercero, porque llegó el triste momento de abandonar la casa que te vio crecer,... batir las alas y echar a volar! (y por supuesto, uno siempre se cuestiona si le habrán crecido lo suficiente las alas!).

En esta hoja quiero plasmar mi inmensa gratitud a todos los que me apoyaron, me ayudaron, me enseñaron y sobre todo me soportaron durante este período.

A mis padres chilenos, la Coneja (María Elena) y a Ramón por su imparcial confianza, apoyo, y cariño: maternal y paternal,...a Ramoncito en particular, porque pocas veces me hizo sentir que estaba fuera de casa y mucho menos que era el jefe, sino el Papá, a pesar de su expresión:..It is good to be the King!!!. Gracias a él por toda su paciencia en trasmitirme (o por lo menos intentar), su vasta sabiduría de la ciencia y de la vida, y por permitirme a través del CECS vivir dignamente en Chile y por ser el autor intelectual de este trabajo.

A Osvaldito por su confianza, por su cariño paternal, y por compartir su genial sapiencia conmigo en apoyar como fuera este proyecto!,...a él, muchas gracias!

A Eddy, mi amigo, quien estuvo incondicionalmente para mi en todo lo que necesité todos estos años en Chile, y por su idea “ingenua” de comparar los lazos de *Shaker* y BK y por supuesto por toda la Biología molecular.

A Pancho Bezanilla por transmitirme su experiencia experimental y por permitirme compartir su tiempo de trabajo cuando viene a Chile.

A Enrico por el ánimo, y conocimiento que me entregó en los macroparches de 70 micra y el Cut-open, y por la fórmula mágica del GUP.

A mis compañeros de laboratorio, a todos sin excepción!, por su paciencia en aguantar a alguien que por idiosincrasia: no es piola!, Gracias a los Patos O y R!, a la Gigi, a Febian, al Chino, a los dos nuevos (Cristián y Pepi), a la Luisita, al Bruno a ellos dos gracias!, y en particular a Pancho Morera, mi hermano chileno, por ser un verdadero amigo a pesar de su diferencia en personalidad con respecto a mi, a él en particular mi eterno agradecimiento y mi incondicional amistad.

A los “extranjeros” del grupo, Gerardo y Yolima, y en particular a los amigos de Talca, mis hermanos “estructurólogos”: Danilo y Wendy.

A mis compañeros del lab. de PL y PS, en particular a mis amigos Marcelo Catalán y Leo.

A todos los profesores y estudiantes de la Facultad Ciencias de la Universidad de Chile, por su cariño y apoyo, en particular a Ricardo Delgado por enseñarme ha confeccionar mis primeras pipetas de “patch”, a la Ceci y a Juan B, a Daniel, y a todos en general, al Dany, por supuesto y en especial a Rodolfo Madrid, mi amigo de siempre, junto a Javier y Martín.

A “loco” Orlando Jorquera, mi amigo de grandes batallas emocionales e intelectuales, a él mi eterno cariño, donde quiera que esté.

Al Profesor Luxoro por su apoyo y por levantar mi ánimo cuando se encuentran piedras en el camino.

A mis hermanos cubanos de Valdivia (Máximo, Niurka, Eloy, Jorge Luis y Joel) a ellos mi eterna gratitud por hacerme sentir que no estaba fuera de Cuba y a los de Santiago, en particular a Tony Ortiz.

A mi amigo uruguayo Gonzalo Ferreira y mi amigo mexicano-argentino Rafael Ferreira.

A todo el Centro de Estudios Científicos de Valdivia por financiar mis estudios, mi estadía en Chile, y por enseñarme que puede existir en Latinoamérica un lugar de excelencia científica donde caben todos, sin diferencias de clases, credos ó razas.

Al gobierno de Chile por su confianza en otorgar una beca Conicyt a un viejo de 35 años para desarrollar su tesis doctoral!

A toda la comisión evaluadora por su tiempo y útiles consejos en el desarrollo y defensa de mi tesis.

Y por último, y no por eso la menos importante, a mi linda esposa, por su inmenso AMOR, COMPRENSIÓN y APOYO, en permitirme dedicarle mucho tiempo a mi otro vicio. Por animarme en mis momentos de debilidad y por su fidelidad en no traicionar nuestros planes y proyectos de vida. A ella, a Karine, mi eterna gratitud por acompañarme y hacerme sentir que no estaba solo. Y por hacer más numerosa y entretenida nuestra familia a través de mi niñito: Nicolás.

A la Mamá (la mamita de Karine y Carlos), por permitirme ser un hijo más, a ella mi eterno cariño y mi inmensa gratitud.

A la nueva adquisición de “tías locas” de Santiago, en particular a la “mamá Morera”

Muchas gracias a Chile, a través de Ramón, (y no es chovinismo) por tratarme como un hijo más en estas lejanas tierras. A todos muchas gracias!

CarlosG.

## INDICE DE MATERIAS

|   |       |
|---|-------|
| LISTA DE FIGURAS.....   | xiii  |
| LISTA DE TABLAS.....  | xvii  |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....  | xviii |
| RESUMEN.....  | xx    |
| ABSTRACT.....   | xxv   |
| <br>  |       |
| INTRODUCCIÓN.....   | 1     |
| 1.    Antecedentes Generales.....   | 1     |
| 2.    El Sensor de Voltaje.....   | 6     |
| 3.    Cargas Involucradas en la Detección del Cambio de<br>Potencial..... | 8     |
| 4.    Mecanismos para el Desplazamiento del Sensor de<br>Voltaje.....     | 10    |
| 4.1.  Desplazamiento Vertical de S4.....                                  | 10    |
| 4.2.  Desplazamiento Rotacional del S4.....                               | 15    |
| 4.3.  Modelo de Remo o Paleta.....  | 15    |
| 4.4.  Cambio de Ángulo de Inclinación del S4.....                         | 17    |
| 4.5.  Otros Mecanismos.....   | 17    |
| <br>  |       |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 20    |
| 1.  Biología Molecular.....   | 20    |
| 1.1.  Bacterias.....  | 20    |
| 1.1.1.  Cepa Bacteriana.....  | 20    |

|   |    |
|---|----|
| 1.1.2. Cultivo de Bacterias.....  | 20 |
| 1.1.3. Obtención de Bacterias Competentes con Cloruro de Calcio.....                    | 21 |
| 1.1.4. Transformación de Bacterias.....   | 21 |
| 1.2. Antibióticos.....  | 22 |
| 1.3. Obtención y Purificación de DNA Plasmidial.....                                    | 22 |
| 1.4. Purificación de Ácidos Nucleicos.....  | 22 |
| 1.5. Caracterización del Clon Utilizado.....  | 24 |
| 1.6. Transcripción <i>in-vitro</i> .....  | 25 |
| 1.6.1. Linearización y Purificación del DNA.....  | 25 |
| 1.6.2. Preparación del RNA mensajero.....   | 26 |
| 1.7. Mutagénesis por PCR: Mutaciones Puntuales y Eliminación Selectiva de Residuos..... | 27 |
| 1.7.1. Mutaciones Puntuales.....  | 27 |
| 1.7.2. Eliminación Selectiva de Residuos.....   | 29 |
| 1.8. Determinación de la Secuencia del DNA.....   | 29 |
| 2. Animales de Experimentación y Microinyección.....                                    | 30 |
| 2.1. Ranas.....   | 30 |
| 2.2. Ovocitos.....  | 31 |
| 2.3. Expresión Heteróloga de Canales en Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....         | 32 |
| 2.3.1. Procedimiento de Microinyección.....   | 32 |
| 3. Electrofisiología.....   | 33 |
| 3.1. Adquisición de los datos.....  | 33 |
| 3.1.1. Técnica de “patch-clamp”.....  | 34 |
| 3.1.1.1. Pipeta de registro.....  | 34 |



|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.1.1.2. | Soluciones de registro.....  | 34 |
| 3.1.1.3. | Registro de corrientes macroscópicas.....  | 35 |
| 3.1.1.4. | Fundamentos teóricos de la técnica de “patch-clamp”.....                                 | 35 |
| 3.1.1.5. | Componentes del sistema de registro.....   | 37 |
| 3.1.2.   | Técnica de “cut-open oocyte vaselina gap”.....   | 38 |
| 3.1.2.1. | Sistema de registro.....   | 39 |
| 3.1.2.2. | Electrodos.....  | 41 |
| 3.1.2.3. | Soluciones de registro.....  | 41 |
| 3.2.     | Adquisición y análisis de las corrientes macroscópicas.....                              | 42 |
| 3.2.1.   | Generalidades.....   | 42 |
| 3.2.2.   | Particularidades.....  | 43 |
| a)       | Determinación de la conductancia macroscópica.....                                       | 43 |
| b)       | Determinación de la constante de activación.....   | 44 |
| c)       | Cálculo del cambio de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) causado por las mutaciones..... | 44 |
| d)       | Análisis de la periodicidad.....   | 45 |
| e)       | Método de la pendiente límite.....   | 47 |
| f)       | Análisis de varianza.....  | 49 |
| 4.       | Experimentos con MTSET.....  | 50 |
| 5.       | Análisis Estadístico y Modelación.....   | 52 |
|          | RESULTADOS.....  | 53 |

|   |    |
|---|----|
| 1. Repercusión de la Longitud del Lazo S3-S4 en la Activación del Canal <i>Shaker</i> .....   | 53 |
| 1.1. Generación del mutante sin lazo S3-S4 .....  | 53 |
| 1.2. Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal <i>Shaker</i> sin lazo S3-S4: 0aa.....  | 54 |
| 1.2.1. Propiedades cinéticas de la apertura y cierre para 0aa.....  | 57 |
| 1.2.2. Propiedades en el equilibrio para el mutante 0aa....   | 60 |
| 1.2.2.1. Dependencia de voltaje para la activación de 0aa: Curva G-V.....   | 60 |
| 1.2.2.2. Cálculo de la Pomax a través de análisis de varianza para 0aa.....   | 62 |
| 1.2.2.3. Determinación de la carga de compuerta, a través del método de la pendiente límite para el mutante 0aa.....  | 64 |
| 1.3. Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal <i>Shaker</i> con diferentes longitudes de lazo S3-S4: Supresiones realizadas conservando parte del extremo C-terminal del lazo.....  | 67 |
| 1.4. Cálculo de la Pomax y carga de compuerta a través del análisis y método de pendiente límite del canal <i>Shaker</i> con diferentes longitudes de lazo S3-S4: Supresiones hechas conservando parte del extremo C-terminal del lazo..... | 74 |
| 2. Repercusión de la Naturaleza Aminoacídica del Lazo S3-S4, en la Activación del canal <i>Shaker</i> .....   | 75 |

|   |     |
|---|-----|
| 3. Repercusión de la Delección de Aminoácidos en el Segmento S3 en la Activación del canal <i>Shaker</i> .....      | 77  |
| 3.1. Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal <i>Shaker</i> con diferentes longitudes del S3.....         | 79  |
| 3.2. Determinación de la Probabilidad máxima de apertura para los mutantes de delección por el lado del S3.....     | 79  |
| 3.3. Cuantificación de las constantes de tiempo de la activación.....   | 81  |
| 3.4. Cuantificación de las $V_{1/2}$ para los mutantes de delección en el S3.....                                   | 83  |
| 3.5. Recuperación de la actividad funcional del canal. (Delección desde la Metionina 312 hasta Isoleucina 360)..... | 85  |
| 4. Evaluación del Modelo de Remo para el canal de $K^+$ <i>Shaker</i> .....   | 87  |
| 4.1. Mutantes de cisteína en diferentes posiciones del S3b con un lazo S3-S4 similar al canal control.....          | 89  |
| 4.2. Mutantes de cisteína en el S3 (F324C) con diferentes longitudes de lazo S3-S4.....                             | 91  |
| 4.3. Mutantes de cisteína en diferentes posiciones del S3b con un lazo S3-S4 corto de 3aa.....                      | 93  |
| 4.4. Determinación de las carga de compuerta para mutantes de lazo corto (3aa) con el segmento S3b cargado.....     | 96  |
| DISCUSIÓN.....  | 100 |
| 1. Papel del lazo S3-S4 en el canal de $K^+$ <i>Shaker</i> .....  | 100 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 1.1.   | Mutante sin Lazo S3-S4: Constantes Cinéticas, Cargas Efectivas de compuertas y Máxima probabilidad de Apertura.....   | 101 |
| 1.2.   | Periodicidad en el C-terminal del lazo S3-S4 a partir de las Constante de Tiempo de Activación ( $\tau_{act}$ ) y las $V_{1/2}$ asociadas a los Sensores..... | 104 |
| 1.3.   | No periodicidad en el C-terminal del lazo S3-S4 a partir de las Constante de tiempo de Desactivación.....   | 107 |
| 1.4.   | Diferentes combinaciones aminoacídicas en el lazo S3-S4.....  | 108 |
| 1.5.   | Definición del lazo S3-S4.....  | 110 |
| 1.6.   | Modelo Estructural para la distribución periódica en el extremo C-terminal del lazo S3-S4.....  | 111 |
| 2.     | Papel del segmento S3 en el canal de $K^+$ <i>Shaker</i> .....  | 115 |
| 2.1.   | Periodicidad en el S3b a partir de las Constante de tiempo para la activación ( $\tau_{act}$ ).....   | 116 |
| 2.2.   | Accesibilidad de residuos de cisteínas en el S3 a MTSET.....  | 119 |
| 2.2.1. | Mutantes de <i>Shaker</i> con sustituciones por cisteínas en el S3b reaccionan a MTSET.....   | 119 |
| 2.2.2. | Mutantes de <i>Shaker</i> con lazo corto y sustituciones por cisteínas en el S3b reaccionan con MTSET.....  | 121 |

|   |        |
|---|--------|
| 2.3. Invariabilidad del número de cargas equivalente de<br>compuerta para el mutante con carga en el S3b:<br>T326R..... | 123    |
| 3. Modelo de paleta o remo para el canal de $K^+$ <i>Shaker</i> .....   | 124    |
| CONCLUSIONES.....   | 128    |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 130    |
| ANEXO I: Listado de artículos publicados durante el trabajo de tesis<br>doctoral.....                                   | AI-1   |
| A. Publicaciones generadas a partir del manuscrito de tesis....   | AI-1   |
| B. Otras publicaciones durante este período.....  | AI-2   |
| ANEXO II: Metodología <i>in extenso</i> para el desarrollo de la tesis<br>doctoral.....                                 | AII-1  |
| 1. Determinación de la Conductancia Macroscópica.....   | AII-1  |
| 2. Ajuste de la G-V ó Po-V a una ecuación de Boltzmann...   | AII-2  |
| 3. Ajuste de Po-V a una Ecuación de Boltzmann a la cuarta para<br><i>Shaker</i> .....                                   | AII-4  |
| 4. Pendiente Límite.....  | AII-5  |
| 5. Análisis de Varianza.....  | AII-8  |
| a. Determinación de la Corriente Promedio en una Membrana<br>con un solo canal y con N canales.....                     | AII-9  |
| b. Determinación de la Varianza en una Membrana con un<br>solo canal y con N canales.....                               | AII-10 |

c. Relación entre la Varianza y la corriente Promedio para N  
canales.....AII-11

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Topología propuesta para una subunidad de la proteína tetramérica del canal de  $K^+$  *Shaker* de *D. melanogaster*.....4
- Figura 2.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica del canal KvAP y *Shaker*.....4
- Figura 3.** Estructura del canal KvAP obtenida por cristalización.....5
- Figura 4.** Movimiento de los sensores de potencial de dos subunidades durante un pulso despolarizante.....7
- Figura 5.** Modelo de  $\alpha$ -hélice deslizante ó tornillo helicoidal propuesto por Durrel y Guy para el desplazamiento del sensor de voltaje.....10
- Figura 6.** Cargas de compuerta para el canal *Shaker*: R362, R365, R368 y R371.....14
- Figura 7.** Modelo de rotación para el sensor en canal *Shaker* propuesto por Cha y Bezanilla.....14
- Figura 8.** Modelo de remo o paleta para el sensor de potencial en los canales KvAP.....16
- Figura 9.** Mapa de restricción del vector pBSTA con el inserto (canal *Shaker*).....25
- Figura 10.** Procedimiento de mutagénesis por PCR.....27
- Figura 11.** Esquema del circuito básico de amplificadores del equipo de “patch-clamp”.....36
- Figura 12.** Esquema del sistema de registro para “patch-clamp”.....37



|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 13.</b> | Esquema simplificado del sistema de registro de COOVG.....   | 40 |
| <b>Figura 14.</b> | Protocolos utilizados para los experimentos de accesibilidad con los mutantes de cisteína del canal <i>Shaker</i> .....              | 51 |
| <b>Figura 15.</b> | Corrientes macroscópicas características de los canales <i>Shaker</i> .....  | 55 |
| <b>Figura 16.</b> | Patrón de corriente para el cálculo de las constantes de tiempo de activación y desactivación.....                                   | 58 |
| <b>Figura 17.</b> | Curvas G-V para el canal <i>Shaker</i> control y para el mutante 0aa.....  | 61 |
| <b>Figura 18.</b> | Análisis de Varianza para el mutante 0aa.....  | 63 |
| <b>Figura 19.</b> | Análisis de la pendiente límite para el canal <i>Shaker</i> control y para el mutante 0aa.....                                       | 65 |
| <b>Figura 20.</b> | Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de delección en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> ..... | 68 |
| <b>Figura 21.</b> | Constantes tiempo de activación y comportamiento periódico en los mutantes de delección del lazo S3-S4.....                          | 69 |
| <b>Figura 22.</b> | Dependencia de potencial y comportamiento periódico inducido por las delecciones del lazo S3-S4.....                                 | 71 |
| <b>Figura 23.</b> | Análisis de Fourier para las constantes de tiempo y $V_{1/2}$ de los mutantes de delección del lazo S3-S4.....                       | 72 |
| <b>Figura 24.</b> | Cálculo de Pomax y del número de cargas equivalentes de compuertas para los mutantes de delección del lazo S3-S4.....                | 74 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 25.</b> | Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de delección con aminoácidos de distinta naturaleza en el lazo S3-S4.....                                      | 75 |
| <b>Figura 26.</b> | Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de delección de todo el lazo S3-S4 y parte del C-terminal del S3.....  | 78 |
| <b>Figura 27.</b> | Análisis de varianza para el mutante sin lazo S3-S4 y parte del S3b: -LAT.....   | 80 |
| <b>Figura 28.</b> | Dependencia de potencial de las cinéticas de activación para los mutantes de delección hacia el lado del S3b.....  | 81 |
| <b>Figura 29.</b> | Diferencia de energía libre para la activación ( $\Delta\Delta G^*$ ) que caracteriza la etapa limitante de la velocidad de apertura en los mutantes de delección hacia el lado del S3b..... | 82 |
| <b>Figura 30.</b> | Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por las delecciones del S3.....   | 83 |
| <b>Figura 31.</b> | Diferencia de energía libre para el paso de reposo del sensor a estado activo ( $\Delta\Delta G^0$ ) durante la apertura del canal inducidas por las delecciones del S3b.....                | 85 |
| <b>Figura 32.</b> | Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes en que se eliminó por completo el segmento S3b y el lazo S3-S4.....  | 87 |
| <b>Figura 33.</b> | Esquema que representa la reacción del MTSET con el grupo sulfidrilo de los residuos de cisteínas.....   | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 34.</b> Alineamiento de las secuencias de los segmentos S2, S3 y S4 de los canales KvAP y <i>Shaker</i> .....   | 89  |
| <b>Figura 35.</b> Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3 en canales con lazo similar al control.....   | 91  |
| <b>Figura 36.</b> Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3a (posición F324) en canales con diferentes longitudes de lazo S3-S4.....  | 92  |
| <b>Figura 37.</b> Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3 en canales con un lazo de 3aa con secuencia: LAI.....   | 94  |
| <b>Figura 38.</b> Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes con el segmento S3b cargado...  | 96  |
| <b>Figura 39.</b> Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por adición de cargas en el segmento S3.....   | 97  |
| <b>Figura 40.</b> Análisis de pendiente límite para el canal <i>Shaker</i> VVA-T326R.....   | 99  |
| <b>Figura 41.</b> Modelo molecular que satisface la periodicidad encontrada a partir de las constantes de tiempo y las $V_{1/2}$ en función de la cantidad de aminoácidos restaurados en la región C-terminal del lazo S3-S4..... | 112 |
| <b>Figura 42.</b> Resultado final después de 1 ns de la dinámica molecular de la región del S3b y parte del lazo S3-S4 en H <sub>2</sub> O.....   | 118 |
| <b>Figura 43.</b> Modelo de cavidad para la región comprendida entre los segmentos S3, el lazo S3-S4 y el segmento S4.....  | 125 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla I.</b> Mutantes de supresión en la región S3-S4 del canal <i>Shaker</i> hacia N-terminal de la proteína.....                                 | 67 |
| <b>Tabla II.</b> Propiedades cinéticas y en el equilibrio de los mutantes de diferentes largos de lazo S3-S4 según la topología de Wallner y col..... | 70 |
| <b>Tabla III.</b> Mutantes de supresión en la región S3b de la proteína-canal <i>Shaker</i> .....   | 78 |

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|       |  |
|-------|--|
| aa    | aminoácido   |
| A     | amperes  |
| Å     | Amstrong, $10^{-10}$ m.                                |
| COOVG | “Cut-open oocyte vaseline gap”                         |
| DNA   | Ácido desoxiribonucleico                               |
| e     | Carga elemental, $1.602 \times 10^{-9}$ coulomb        |
| HEPES | Ácido (N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico |
| Hp    | Potencial de mantención                                |
| I     | corriente macroscópica                                 |
| i     | corriente unitaria                                     |
| gi    | conductancia unitaria                                  |
| Po    | Probabilidad de canales abiertos                       |
| k     | Constante de reacción de segundo orden                 |
| KMES  | 2-(N-morfolino)etanosulfonato de potasio               |
| M     | mol/litro de solución                                  |
| mV    | Milivolt, $10^{-3}$ volt.                              |
| mRNA  | RNA mensajero  |
| MTS   | Metanotiosulfonato                                     |

|                    |   |
|--------------------|---|
| MTSET              | [2-(Trimetilamonio) etil]metanotiosulfonato                           |
| NaMES              | 2-(N-morfolino)etanosulfonato de sodio                                |
| pB                 | pares de bases  |
| PCR                | Reacción en cadena de la polimerasa                                   |
| Q                  | Carga eléctrica   |
| RNA                | Ácido Ribonucleico  |
| S                  | Segundo   |
| n                  | nano  |
| p                  | pico  |
| T                  | Temperatura absoluta (medida en grados Kelvin)                        |
| V                  | Volt  |
| $V_{1/2}$          | Potencial al que se encuentra el 50% de los sensores en estado activo |
| Z                  | Carga equivalente aparente  |
| $\delta$           | fracción del campo eléctrico  |
| $\mu\text{m}$      | Micrómetro, $10^{-6}$ metro   |
| $\mu\text{M}$      | Micromolar, $10^{-6}$ molar   |
| $\tau$             | Constante de tiempo   |
| $\Delta\Delta G^*$ | Diferencia de energía libre para la activación                        |

$\Delta\Delta G^\circ$

Diferencia de energía libre para el paso del estado de reposo de los sensores al estado activado



## RESUMEN

Los canales de potasio dependientes del potencial, como el canal *Shaker*, son tetrámeros formados por subunidades de seis segmentos de transmembranales (S1-S6) (Shih y Goldin, 1997). En ellos, las “partículas cargadas” capaces de “sentir” el potencial a través de la membrana resultaron ser aminoácidos básicos (argininas ó lisinas) que se encuentran en el segmento S4, propuesto como el sensor de potencial (Liman y col., 1991; Papazian y col., 1991; Bezanilla y col., 1991; Perozo y col., 1994; Aggarwal y MacKinnon, 1996; Larsson y col., 1996; Mannuzzu y col., 1996; Seoh y col., 1996; Yang y col., 1996; Yussaf y col., 1996; Smith-Maxwell y col., 1998a y b; Díaz y col., 1998, Ledwell y Aldrich, 1999; Latorre y col., 2003). Sin embargo, aún no existe un consenso acerca de qué otros segmentos ó regiones, diferentes al S4, podrían estructurar al sensor de potencial, y cuál sería el mecanismo mediante el cuál estos canales detectan los cambios de voltaje para su activación.

Por ello, este trabajo estuvo dirigido a dilucidar el papel de regiones estructurales muy cercanas al S4, como el lazo S3-S4 y el segmento S3, en la activación del canal de K<sup>+</sup> *Shaker*. Teniendo en cuenta que la distancia exacta que se mueve el sensor de potencial es desconocida, pensamos que

movimientos grandes del segmento S4 deberían estar restringidos por la longitud del lazo S3-S4. Para comprobar esta hipótesis se construyeron mutantes de eliminación con lazos S3-S4 de diferentes largos, hasta la completa eliminación del mismo, así como mutantes sin lazo S3-S4 y con deleciones en el segmento S3b. Los resultados muestran que la eliminación total del lazo S3-S4 no afecta la probabilidad máxima de que los canales estén abiertos, y sin embargo, modifica a la mitad el número total de 13 cargas de compuerta para el canal *Shaker*, haciendo poco probable un desplazamiento muy grande (15 Å) para el segmento S4. Por otro lado, tanto las constantes de tiempo de la activación del canal *Shaker*, como el punto medio de las curvas de activación por potencial, varían periódicamente en función del largo del lazo. En mutantes con lazos de menos de 7 aminoácidos hacia el C-terminal, es posible demostrar que esta periodicidad es típica de una estructura de  $\alpha$ -hélices. De ser esta región una continuación natural del segmento S4, esta sería una demostración indirecta de que el segmento S4 tiene una estructura en  $\alpha$ -hélice.

La eliminación del lazo S3-S4 y de parte del segmento S3b (desde leucina 327 hasta la isoleucina 360) origina una dramática disminución de la probabilidad máxima de encontrar los canales abiertos. Estas proteínas no

son funcionales si se continúan eliminando los aminoácidos del segmento S3b. Sorprendentemente, la expresión ó funcionalidad de estos canales se vuelve a recuperar, cuando se ha eliminado el lazo S3-S4 y todo el S3b. Estos resultados indican que el segmento S3b no es vital para la activación del canal *Shaker*.

Para el caso de los mutantes de eliminación del segmento S3b, encontramos también un comportamiento periódico entre las constantes de tiempo y la cantidad de aminoácidos presente en esta región de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la periodicidad hallada hacia el C-terminal del lazo S3-S4, nosotros encontramos un punto de quiebre de dicho comportamiento periódico, en la treonina 329. Un resultado similar se encontró, al realizar la dinámica molecular de esta región por 1ns en H<sub>2</sub>O. Dicho resultado apuntó no sólo a una coincidencia en el punto de quiebre de esta hélice (treonina-329), sino que permitió comprobar que un medio acuoso, la hélice mantiene su estructura secundaria. Sorprendentemente coincidentes, fueron también los valores determinados para el ángulo de desfase (153°) entre ambas hélices, obtenido por la simulación de esta región, en relación al obtenido de los datos experimentales (158°).

Por otro lado, a fin de dilucidar la posible participación del S3 como componente del sensor de voltaje en el canal *Shaker*, nosotros generamos mutantes con cisteínas ubicadas a todo lo largo del segmento S3b de diferentes largos de lazo S3-S4, y mutantes con cargas positivas en dicho segmento. Los estudios de sustitución por cisteínas en diferentes posiciones del segmento S3b, develaron una reactividad a MTSET, independientemente de la longitud del lazo S3-S4, y sin grandes diferencias de los valores de constantes de reacción, atendiendo al estado cerrado ó abierto del canal. Sin embargo, los valores de constante de reacción obtenidas fueron del orden de  $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , diferentes en dos ordenes de magnitud al valor reportado para la reacción de MTSET con cisteínas libres. Este resultado nos permitió concluir que si bien, el MTSET es accesible hasta la posición I-315 del canal, existe un impedimento estérico para la reacción del reactivo con las cisteínas del canal. Sobre la base de estos resultados, nosotros pensamos que esta región no está expuesta completamente hacia el lado extracelular, sino que se encuentra en el interior de la membrana formando una cavidad a la que el MTSET tiene acceso hasta la posición I-315. Este resultado fue corroborado al realizar un “docking” entre el MTSET y el S3b con cisteínas estructurado como una

cavidad con grietas ó hoyos acuosos a los que accedió el reactivo hasta la posición I-315.

Por último, el hecho agregar una carga positiva a la estructura del S3b (T326R) y no detectar cambios del número total de cargas de compuerta, durante la activación del canal, se interpreta como que el segmento S3 no se mueve. Por otra parte, nuestros resultados también apuntan a que el modelo de “remo ó paleta” propuesto para la primera estructura cristalina del sensor, en el caso particular del canal *Shaker*, es incorrecto.

Nosotros concluimos que un modelo de desplazamiento muy pequeño para el sensor de voltaje, sin un papel protagónico ni para el lazo S3-S4, ni el segmento S3, sería el adecuado, durante la activación del canal de  $K^+$  *Shaker*.

## ABSTRACT

Voltage-dependent  $K^+$  channels, as *Shaker* potassium channel, are protein tetramers each of which is formed by six transmembrane segments (S1-S6) (Shih and Goldin, 1997). In these channels, the “charged particles” that detect the electrical field changes, are basic aminoacids (arginines or lysines) forming part of the S4 transmembrane segments. These segments were proposed as voltage sensor (Liman et al., 1991; Papazian et al., 1991; Bezanilla et al., 1991; Perozo et al., 1994; Aggarwal and MacKinnon, 1996; Larsson et al., 1996; Mannuzzu et al., 1996; Seoh et al., 1996; Yang et al., 1996; Yussaf et al., 1996; Smith-Maxwell et al., 1998a and b; Díaz et al., 1998, Ledwell and Aldrich, 1999; Latorre et al., 2003). However, there is no consensus about other regions or segments, different from the S4 segment, which could also form part of the voltage sensor structure and be part of the mechanism that detects the electrical field changes, during activation of these channels.

For this reason, this work was directed to evaluate the role of the structural regions, in close proximity to S4, as the S3-S4 linker and the S3 segment during the activation of *Shaker*  $K^+$  channels. Bearing in mind, that the exact

distance that the voltage sensor moves is not known, we think that a large displacement of S4 segment should be restricted by the length of the S3-S4 linker. To verify this hypothesis, we constructed mutants with different lengths of the S3-S4 linker, even the complete elimination of the linker, as well as mutants without the S3-S4 linker and further deletions in the S3b segment. The results show that the total elimination of the S3-S4 linker, does not affect the maximum open probability, nevertheless, the 13 total equivalent charges of *Shaker* K<sup>+</sup> channels were reduced to half that number. These results suggest that a large displacement of the S4 segment is unlikely. On the other hand, both the activation time constant and the midpoint of the voltage activation curve of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel macroscopic currents becomes a periodic function of the S3-S4 linker length for linkers shorter than 7 aa residues. The periodicity is typical of an  $\alpha$ -helix. If this region is a natural continuation of the S4 segment, would be an indirect evidence, that the S4 segment has an  $\alpha$ -helix structure. The complete deletion of the S3-S4 linker and part of the S3b segment (from Leu-327 up to the Iso-360) produces a dramatic decrease of the maximum open probability of finding the channel open. These proteins turn into non functional channels if we continue eliminating aminoacid from the S3b



segment. Surprisingly, the expression or functionality of these channels is recovered when both the S3-S4 linker and all of the S3b segment have been eliminated. These results indicate that the S3b segment is not essential for the activation of *Shaker* potassium channels. In the case of the S3b deletion mutants, we also find a periodic behavior between the activation time constants and the number of the aminoacids in this region of the protein. Nevertheless, unlike the periodicity of C-terminal of the S3-S4 linker, we find at treonine-329 a failure point in the periodic behavior. A similar result was obtained by molecular dynamics simulation of this region, in H<sub>2</sub>O, and for 1ns duration time.

This result pointed not only at a coincidence in the point of failure of the helix (treonine-329), but allowed to verify the secondary structure of the helix is not disrupted in water. Surprisingly coincidental, they were also the values determined for the angles (153°) between both helices, obtained by simulation of this region, in relation ship to the values obtained experimentally (158°).

In order to explain the possible participation of the S3 segment as a component of the voltage sensor in *Shaker* channel, we generated single point cysteine mutants along the S3b segment having different lengths of

S3-S4 linker. Another group of mutants with positive charges in this segment were constructed.

The single cysteine substitution studies at different positions of the S3b segment, showed the same reactivity to MTSET, independently of the S3-S4 linker length, which little modifies the values of reaction constants, whether in the closed or open states of the channel. Nevertheless, the values of the reaction constants obtained were of the order of  $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . This value is two orders of magnitude different to the MTSET rate of reaction with free cysteine. This result allowed us to conclude that although MTSET is accessible up to position I-315 of the channel, there is steric hindrance for the reagent to react with the channel cysteine. Based on these results, we think that this region is not exposed completely towards the extracellular side, but this region is kept into the membrane, forming a cavity to which the MTSET has access up to the position I-315. This result was corroborated when a docking was performed between the MTSET and the cysteine of the S3b constructed as a cavity with cracks or watery holes to which the reagent accessed up to the position I-315.

Finally, the fact of not detecting alterations of the total number of gating charges, during activation of the mutants, which had replaced the threonine-

326 (located in the center of the S3b) by arginine, strongly suggests, that the S3 segment practically does not move. On the other hand, our results also are indicative that the paddle model proposed for the first crystalline structure of the sensor, is incorrect for the *Shaker* channel.

We conclude that a model with a small displacement of the voltage sensor, without a leading role of the S3-S4 linker or the S3b segment, would be the suitable one, during the activation of the *Shaker* K<sup>+</sup> channels.

## INTRODUCCIÓN

### *1. Antecedentes Generales*

Desde el origen mismo de los seres vivos, las células primitivas se rodearon de una envoltura celular, separándose del medio que las rodeaba e iniciando el intercambio de materia y energía con su entorno. Para el caso de los iones, se seleccionaron proteínas integrales de membrana que permiten el paso de éstos con gran eficiencia y alta selectividad, denominadas canales de iones y que son imprescindibles para todos los sistemas vivos.

Los canales de iones son una familia muy heterogénea de proteínas transmembranales cuyo estudio ha dado un gran salto en los últimos años. En particular, el trabajo desarrollado por el laboratorio del Dr. MacKinnon que permitió la cristalización y la elucidación de la estructura de los canales de cloruro y potasio hizo de un sueño una realidad (Doyle y cols., 1998; Dutzler y cols., 2002). En la actualidad, se pueden apreciar las estructuras cristalinas, bien resueltas para estas proteínas transmembranales, que dan cuenta de un largo historial experimental, que comenzó por la década del 1950 con los

artículos clásicos de Hodgkin y Huxley (1952) y dio a la luz lo que hoy se conoce como la Biofísica de los canales de iones.

Esta cristalización comenzó por canales bacterianos selectivos a  $K^+$ , formados por sólo 2 segmentos transmembranales y se dirigió la atención a una región común para todos los canales de  $K^+$ : **el poro de conducción de iones** (Doyle y cols., 1998, Morais-Cabral y cols., 2001). En este dominio estructural se localizó la región que discrimina a un tipo de ión por sobre las demás especies iónicas, conocida como el **filtro de selectividad iónica**. En esta región se encuentra la “secuencia firma” (“*signature sequence*”), conservada en prácticamente todos los canales de  $K^+$ : **TVGYGD** (treonina-valina-glicina-tirosina-glicina-ácido aspártico). En estos aminoácidos radica una de las propiedades biofísicas esenciales de los canales: la conducción selectiva de iones. El filtro de selectividad cataliza la deshidratación, transferencia y rehidratación de los iones  $K^+$  en unos 10 ns, lo que significa que los iones se mueven en el filtro con una rapidez comparable a la que tienen en la solución (Morais-Cabral y cols., 2001). La más asombrosa sugerencia de la cristalización de esta región (poro de conducción) es lo conservado de su estructura entre todos los canales de  $K^+$ , incluso hasta los más distantes evolutivamente.

Otra propiedad esencial de los canales es la capacidad de abrirse en respuesta a un estímulo apropiado. Según sea la naturaleza de este estímulo, los canales se clasifican en activados por ligando (neurotransmisores y segundos mensajeros), activados mecánicamente, activados por temperatura y activados por el potencial de la membrana (canales voltaje-dependientes). Dentro de los activados por voltaje, uno de los paradigmas lo constituyen los canales pertenecientes a la superfamilia del S4.

Los canales de  $K^+$  de esta superfamilia (S4), corresponden a proteínas compuestas por 6 segmentos transmembranales (S1-S6), que forman una estructura cuaternaria homotetramérica ó heterotetramérica. En el centro de esta estructura se localiza el poro de conducción con su filtro de selectividad, formado por el lazo S5-S6 (región P) de cada uno de los cuatros monómeros. La región P se acopla de alguna forma al sensor de potencial el cual, dadas las innumerables evidencias experimentales, está formado por los segmentos S4 de cada una de las subunidades (Shih y Goldin, 1997; Bezanilla, 2000) (La Figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de un representante de la familia S4, el canal de potasio *Shaker* de *Drosophila*.)



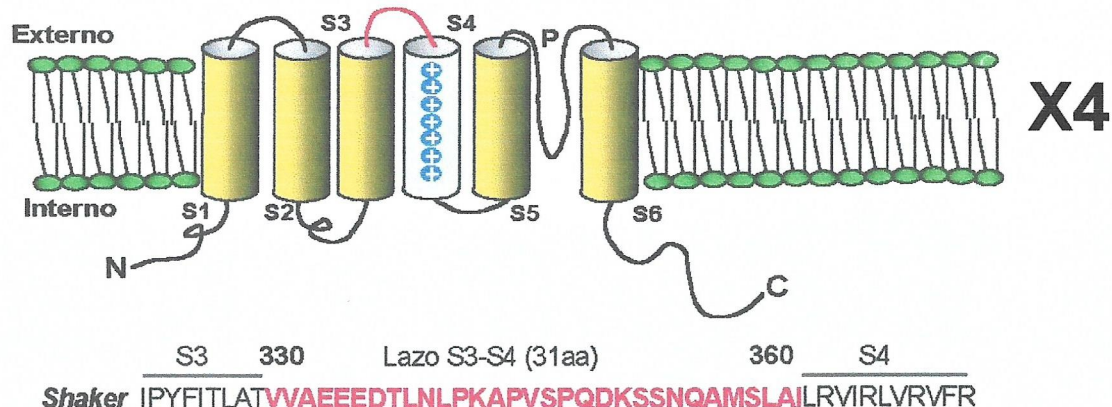


Figura 1. Topología propuesta para una subunidad de la proteína tetramérica del canal de potasio *Shaker* de *Drosophila melanogaster*. (X4 indica que el monómero mostrado se repite cuatro veces en el canal funcional). Se muestra con más detalle la secuencia de 31 aminoácidos que, según según Wallner y col. (1996), forma el lazo S3-S4, región en la que se centraron los estudios realizados en esta tesis.

En una serie de tres artículos, el grupo del Dr. MacKinnon ha relatado el clonamiento-purificación (Ruta y col., 2003), cristalización de alta resolución (Jiang y cols., 2003a) y mecanismo de activación dependiente de voltaje para

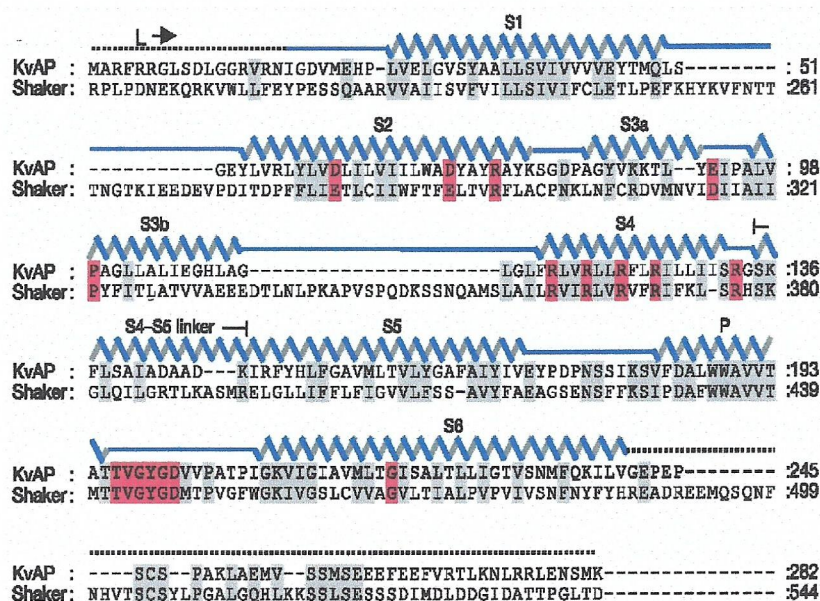
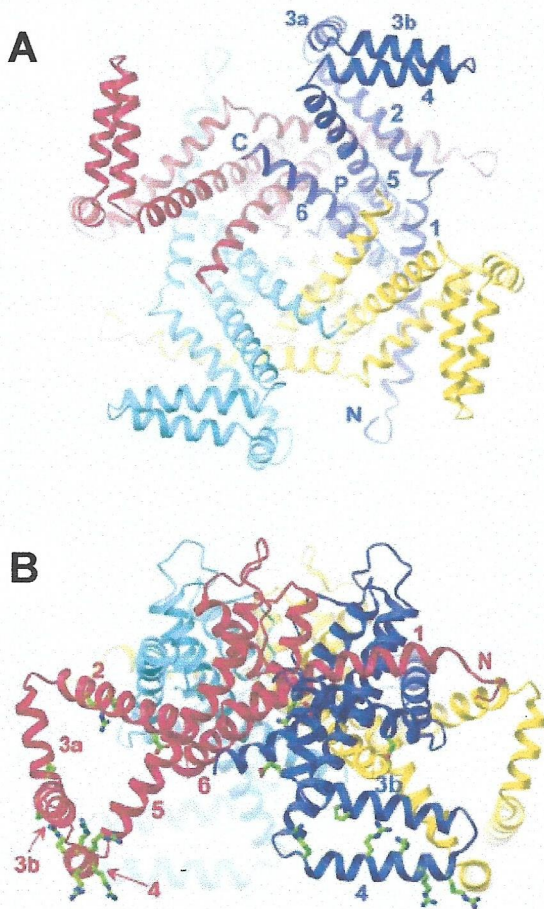


Figura 2. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del canal KvAP y *Shaker*. En rojo se destacan las regiones esenciales para la funcionalidad de los canales de potasio dependientes de potencial (Jiang y col., 2003a).

un canal de  $K^+$  de arqueobacteria (Jiang y col, 2003b), con una secuencia y propiedades similares a sus contrapartes eucariontes, llamado KvAP. Este mecanismo de activación será descrito más adelante.

Como se aprecia del alineamiento de la Figura 2, existen regiones conservadas entre KvAP y *Shaker*.



**Figura 3. Estructura del canal KvAP obtenida por cristalización.** A. vista desde el lado intracelular. B. vista lateral. Tomado de Jiang y col., 2003 a.

Estos estudios de KvAP produjeron dos estructuras: una de 3.2 Å de resolución (formada por el canal KvAP completo, del S1 a S6) (Figura 3), y una segunda estructura con una más alta resolución (1.9 Å) (que comprende sólo los segmentos del S1 a S4).

Con el fin de estabilizar el segmento S4 que, por su carácter excepcionalmente dinámico, dificulta el proceso de cristalización, se hicieron reaccionar ambas proteínas con un fragmento de anticuerpo Fab, que se une al lazo S3-S4 (de corta longitud con



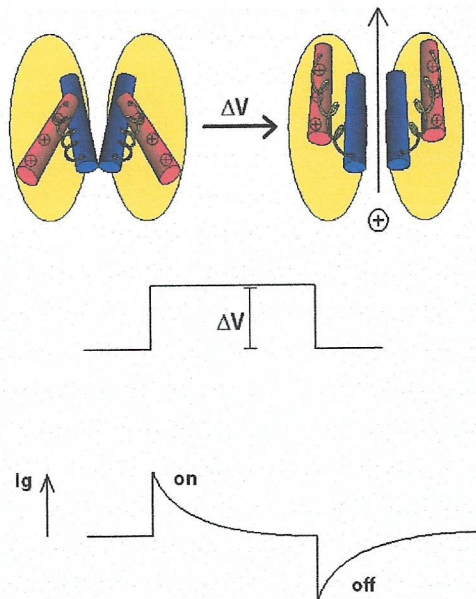
respecto al de *Shaker*, ver alineamiento Figura 2).

Esta estructura cristalina del sensor de voltaje resultó ser muy distinta a los modelos creados por los biofísicos, por lo que ha motivado una intensa discusión llegando a ser uno de los temas de mayor actualidad en la biofísica de canales de iones.

## 2. El Sensor de Voltaje

Mediante la clonación de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{K}^+$ , se determinó que existía una zona bastante conservada para todos los canales de 6 segmentos de transmembrana activados por cambios del potencial de membrana. Los alineamientos mostraron que en cada uno de los segmentos de transmembrana S4 había una lisina o arginina cada 3 aminoácidos (ver Figura 2). Esto hizo suponer que estas cargas positivas estaban involucradas en la detección de cambios en el potencial de membrana (Noda y cols., 1984). Los estudios posteriores de reemplazo de estas cargas positivas por aminoácidos neutros, mostraron una disminución de la dependencia de potencial de estos mutantes. Estos resultados demostraron la participación de dichos residuos en la apertura de la compuerta (“*gate*”) de activación, por lo que se llamaron cargas de compuerta o “*gating charges*” (Figura 4),

(Sthumer y cols, 1989; Liman y Hess, 1991; Papazian y cols., 1991; Logothetis y cols, 1992).



**Figura 4. Movimiento de los sensores de potencial de dos subunidades durante un pulso despolarizante.** De arriba hacia abajo, se muestra el movimiento de los sensores de potencial de 2 subunidades, durante un pulso despolarizante. El movimiento de residuos cargados de la proteína, genera una corriente conocida como “*gating current*” o corriente de compuerta. La integral de esta corriente es igual a la carga de compuerta transportada durante la despolarización.

Por otra parte, el movimiento de cargas origina una corriente, por ello fue relevante la primera medida directa del movimiento de estas cargas de compuerta, conocida como corriente de compuerta o “*gating currents*” (Figura 4), (Armstrong y Bezanilla, 1973; Keynes y Rojas, 1974). Las mediciones de las corrientes de compuerta en el canal *Shaker* silvestre y en mutantes de S4 han demostrado de manera concluyente que los residuos básicos son o forman parte del sensor de voltaje (Seoh y col., 1996; Aggarwal y MacKinnon, 1996).

### ***3. Cargas involucradas en la detección del cambio de potencial***

De los residuos básicos probados, en el canal *Shaker*, a través de sustituciones por aminoácidos no cargados en el segmento S4 de cada subunidad, sólo cuatro contribuyen a la carga efectiva de compuerta: R362, R365, R368 y R371 (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y cols., 1996). Por otra parte, se encontró que el residuo E293 localizado fuera del segmento de transmembrana S4, contribuye también a la carga equivalente de compuerta. Este resultado se liga al trabajo de Papazian y cols. (1995) y Tiwara-Woodruff y cols. (1997), quienes demostraron que las cargas positivas del S4 interactúan electrostáticamente con residuos negativos de los segmentos S2 y S3. Esta conclusión se alcanzó utilizando una técnica de biología molecular conocida como rescate por supresión intragénica. En el caso del canal de  $K^+$  *Shaker* la neutralización de los residuos K374 o R377 producen un bloqueo de la maduración de la proteína, sugiriendo que su plegamiento es inadecuado. El canal mutante K374Q se rescata con una alta eficiencia si se introducen simultáneamente en él las mutaciones E293Q o D316Q. Estos resultados sugieren que existe una relación electrostática entre residuos negativos de los segmentos S2 y S3 con residuos positivos del segmento S3 y

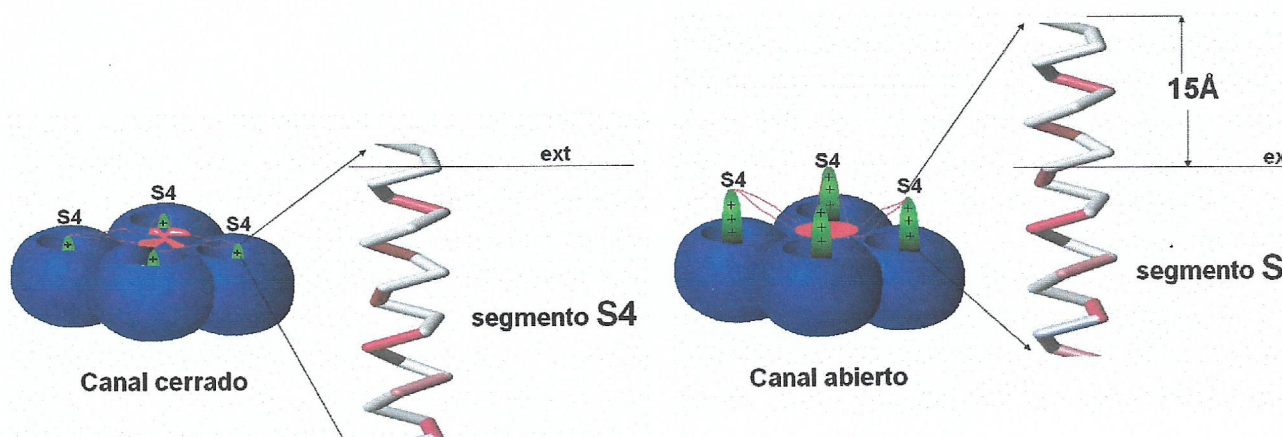
S4, formando una red de interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura del canal (Papazian y cols. 1995; Tiwara-Woodruff y cols, 1997)

Para el canal de  $K^+$  tipo *Shaker* se ha determinado a través del método de la pendiente límite (Almers, 1978; Sigg y Bezanilla, 1997; ver anexo II) que son 13 el número de cargas equivalentes asociadas a la apertura. Este número coincide con el número total de carga equivalente (Q) calculado a través de la integración de la corriente de compuerta y dividida por el número total de canales (N). A través de este método conocido como Q/N se puede obtener la carga total por canal que se mueve a través de todos los estados conformacionales cerrados y abiertos de la proteína. Sobre la base de estos resultados se concluyó que toda la carga de compuerta está asociada directamente a la apertura del canal. (Noceti y cols. 1996; Sheoh y cols. 1996)

#### 4. Mecanismos para el desplazamiento del sensor de voltaje

##### 4.1. Desplazamiento vertical del S4

Para poder explicar el movimiento de aproximadamente tres cargas elementales por cada subunidad en los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se propuso sobre la base de modelos moleculares, que el segmento S4 debería sufrir un desplazamiento de aproximadamente 15 Å (Figura 5), (Durell y Guy, 1992).



**Figura 5. Modelo de  $\alpha$ -hélice deslizante ó tornillo helicoidal para el desplazamiento del sensor de voltaje.** Modelo propuesto por Durrell y Guy (1992), para el desplazamiento del sensor de voltaje en canales activados por cambio en el potencial de membrana. De izquierda a derecha se ilustran los estados cerrado y abierto o activado del canal.

La demostración experimental de la existencia del desplazamiento no tardó en llegar (Yang y Horn, 1995; Mannuzzu y cols., 1996; Larsson y cols., 1996; Yang y cols., 1996). Aunque estos experimentos demuestran que el segmento S4 cambia de posición durante la activación del canal, la magnitud



del desplazamiento aún es desconocida y, como veremos mas adelante, es una incógnita que ha dado lugar a un acalorado debate.

Tanto para los canales de  $\text{Na}^+$  como para el canal de  $\text{K}^+$  *Shaker* se demostró que el segmento S4 se hace más accesible desde el medio externo durante la despolarización de la membrana. Para ambos canales, la estrategia experimental ha sido similar: sustituir residuos localizados en S4 por cisteínas y detectar su accesibilidad usando reactivos para grupos -SH de las cisteínas, impartándole una carga positiva o negativa.

Este método ha sido denominado “mutagénesis exploratoria con cisteínas” (“cysteine accessibility scanning mutagenesis”, SCAM) y los reactivos más comúnmente usados son los derivados del metanotiosulfonato (p.ej. MTSET: metanotiosulfonato-etiltrimetilamonio). Si la reacción tiene algún efecto sobre las corrientes iónicas uno puede establecer el grado de accesibilidad de una determinada cisteína midiendo la velocidad de reacción a diferentes potenciales de membrana. Por ejemplo, si el sensor de potencial se desplaza hacia el medio externo durante una despolarización habrá cisteínas en él capaces de reaccionar con el reactivo para grupos -SH agregado al medio externo. Esto será detectado como un cambio en las corrientes iónicas. Estos cambios no se observarán cuando hiperpolarizamos la membrana ya que el

desplazamiento del sensor hacia el medio interno de la célula hace que estas mismas cisteínas “desaparezcan” del medio externo. Larsson y col. (1996) determinaron que cuando el canal de  $K^+$  *Shaker* está en su configuración cerrada, el residuo R362 quedaba expuesto al medio externo, el residuo R365 era inaccesible desde los medios tanto interno como externo, y los residuos que iban desde el R368 al K380 eran accesibles desde el medio interno. Por otra parte, una despolarización promueve un cambio del sensor tal que ahora los residuos R362 y R365 son accesibles desde el medio externo, los residuos R368 al R371 se hacen inaccesibles desde ambos medios y sólo el residuo K380 es accesible desde el medio interno en estas condiciones.

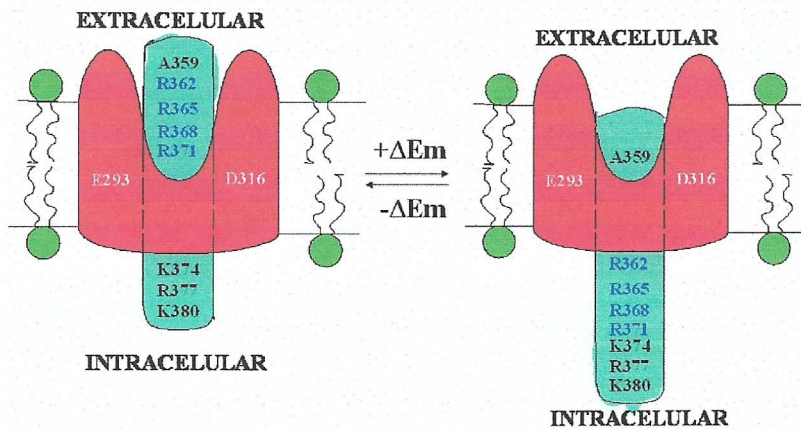
De estos experimentos y de los efectuados con el canal de Na emerge la idea de que la mayor parte de las cargas de compuerta no están embebidas en el dieléctrico de la membrana, sino que estarían localizadas en vestíbulos accesibles a las soluciones que rodean el canal.

Sin embargo, los experimentos de accesibilidad descritos anteriormente, debido al tamaño de la sonda utilizada (el MTSET tiene aprox. 0.8 nm de diámetro), puede que no den cuenta de todos los grupos accesibles de un lado y a un potencial determinado. Este problema ha sido resuelto mediante el uso del método de mutagénesis exploratoria con histidinas (Starace y cols.,

1997). En este método la sonda usada son los protones quienes requieren de un grupo titulable y que pueda ser manejado en un rango de pH compatible con la sobrevivencia de la preparación biológica. El grupo ideal es en este caso el anillo imidazol presente en la histidina que tiene un pKa cercano a 6. Por lo tanto, este grupo estará principalmente protonado a pH 5 y mayoritariamente desprotonado a pH 9. Supongamos que un residuo en el segmento S4 es reemplazado por histidina, y que este residuo atraviesa todo el campo cuando el canal va desde la configuración abierta a la cerrada. En este caso particular, el establecimiento de un gradiente de pH a través de la membrana, por ejemplo, pH 5 a un lado y 9 al otro lado de la membrana, va a promover un transporte de protones ya que la histidina contenida en el sensor capturará un protón en el lado de pH 5 y lo liberará en el lado de pH 9. Esta histidina se comportará como un transportador de protones y por lo tanto creará una corriente de estos iones. Starace y Bezanilla (2001) demostraron que cuando los residuos R362, R365, R368 y R371 son reemplazados por histidinas es posible medir una corriente de protones en presencia de un gradiente de pH.

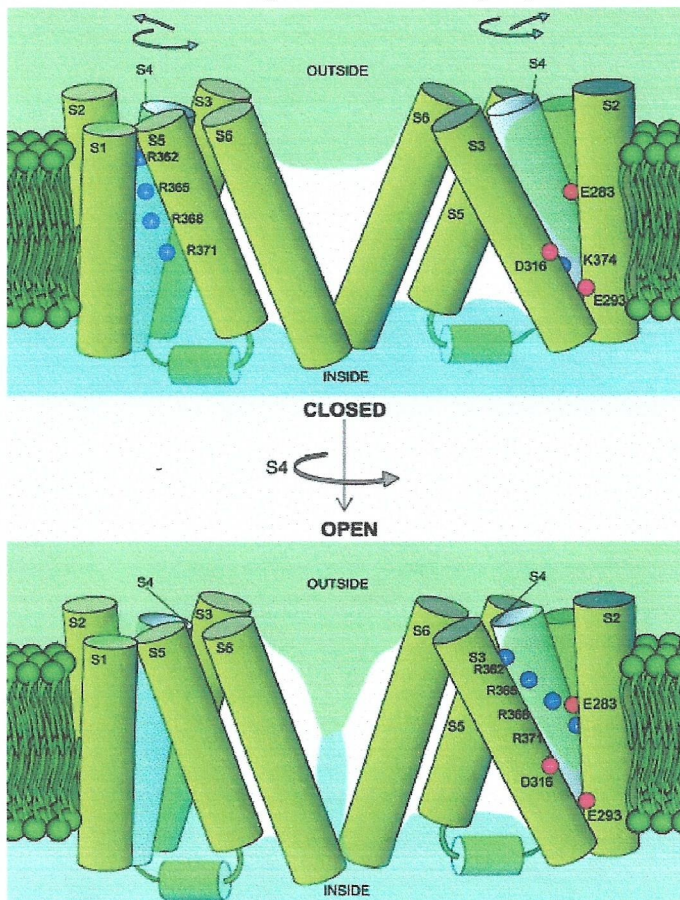






**Figura 6. Cargas de compuerta para el canal Shaker: R362, R365, R368 y K371.** Los aminoácidos cargados positivamente: 362, 365, 368 y 371, son los responsables de la carga de compuerta. Como se ilustra en la figura se hacen accesibles por ambos lados ante cambios del potencial de membrana (Starace y col., 2001).

En otras palabras, estos experimentos demuestran que las histidinas en estas posiciones se exponen al medio externo a potenciales despolarizantes y al medio interno a potenciales hiperpolarizantes. Estos residuos se mueven a



través de todo el campo eléctrico (ver Figura 6).

**Figura 7. Modelo de rotación para el S4 propuesto por Cha y Bezanilla en 1999.** La figura superior muestra el canal en su configuración cerrado. Se ilustran sólo 2 monómeros siendo la región central la zona conductora de iones. Una rotación de 180° del S4 modifica a la configuración del canal a un estado de abierto (figura inferior).

#### 4.2 Desplazamiento rotacional del S4

En el año 1999, el grupo del Dr. Francisco Bezanilla propuso un modelo de rotación del S4 (Figura 7) basado en la medición de distancias con sondas fluorescentes introducidas en los residuos 351, 352 y 353 en el canal de potasio *Shaker* (Cha y cols.; 1999). Los cambios de distancias observadas como consecuencias de los desplazamientos del sensor del canal son bastante pequeños,  $\sim 5\text{\AA}$ . El modelo rotatorio plantea que los cuatro primeros residuos básicos dan a una grieta conectada con el medio intracelular a potenciales hiperpolarizantes y a una grieta conectada con el medio extracelular a potenciales despolarizantes (Figura 7) (Cha y cols., 1999; Bezanilla, 2000).

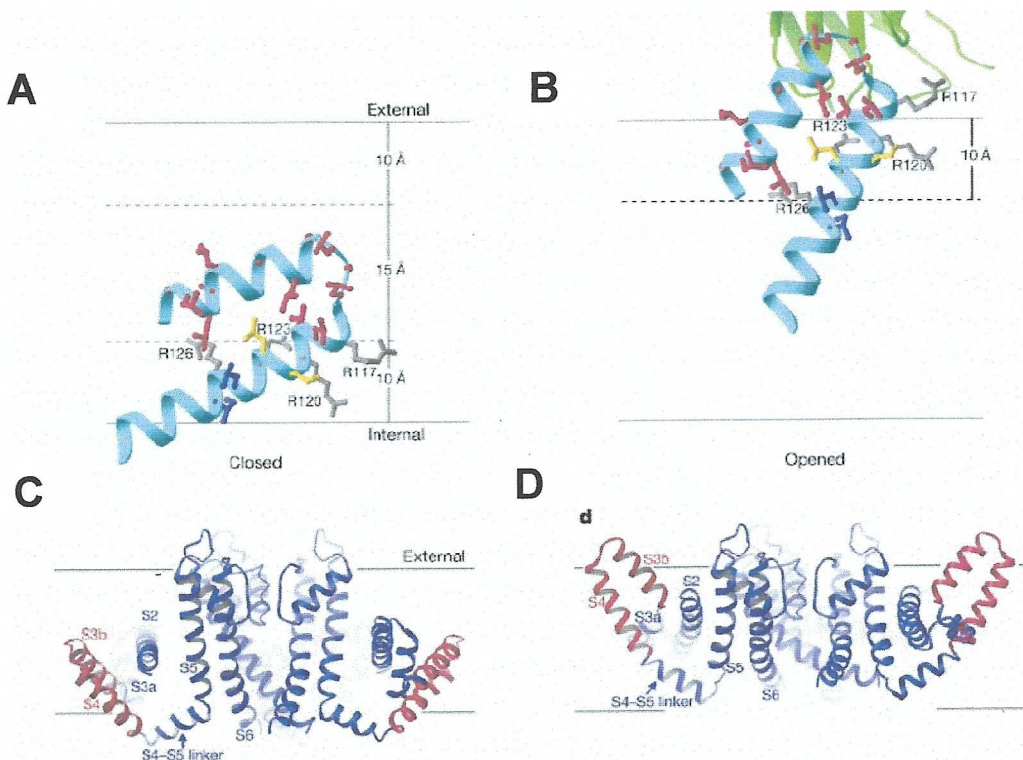
Una simple rotación puede que no explique todos los datos experimentales, porque cuando todas las cargas están en una grieta, los residuos en el lado opuesto de la hélice serían accesibles desde la otra grieta y tendrían una dependencia de voltaje exactamente opuesta (Bezanilla, 2002).

#### 4.3 Modelo de remo o paleta

Los modelos antes mencionados, han guiado el desarrollo experimental y conceptual de los modelos de “gating” más corrientes por lo que pueden considerarse como modelos canónicos para el movimiento de la carga.



Por el contrario, el reciente cristal del canal de  $K^+$  bacteriano dependiente de potencial, KvAP (Jiang y cols., 2003a), muestra que los segmentos S4 están en gran parte embebidos en los lípidos, y conduce a un modelo muy diferente para el movimiento del sensor de voltaje. Se propone la existencia de una paleta sensor de voltaje ("voltage sensor paddle"), cuya estructura consiste en un dominio hélice-vuelta-hélice ("helix-turn-helix"), formado por parte del segmento S3, el lazo S3-S4 y el S4. Se plantea, además que se mueve como una unidad a través de la bicapa lipídica durante el movimiento de la carga (Jiang y cols., 2003b) (Figura 8).



**Figura 8. Modelo de remo o paleta para el sensor de potencial en los canales KvAP.** En las figuras (a) y (b) se muestra la estructura de paleta para el sensor de voltaje en sus configuraciones cerrado y abierto respectivamente, El "paddle" esta formado por S3b, lazo S3-S4 y segmento S4. (c) y (d) muestran el movimiento del sensor (rojo) conjuntamente con todos los demás segmentos de transmembrana. Sólo son mostrados 2 monómeros del canal para simplificar (tomado de Jiang y col., 2003b)

Este es un concepto radicalmente diferente del movimiento de la carga, pues está en desacuerdo con la noción predominante de que el segmento S4 en gran parte está rodeado por la solución acuosa a cualquier potencial de membrana como se muestra en las Figuras 5, 6 y 7 (Bell y cols., 2004; Vemana y cols., 2004).

#### *4.4. Cambio del ángulo de inclinación del S4.*

Otra posibilidad para el movimiento del sensor de potencial es un cambio en el ángulo de inclinación del segmento S4 lo que cambiaría la exposición de los residuos cargados de adentro hacia afuera. No hay evidencias directas para un cambio del ángulo de inclinación del S4, sin embargo, los experimentos de transferencia de energía por resonancia utilizando lantánidos (LRET) (Cha y cols., 1999) muestran un cambio de ángulo de inclinación del lazo S3-S4 durante la activación. Si el segmento S4 estuviera alineado con el lazo, podría estar sufriendo un cambio en su ángulo de inclinación.

#### *4.5 Otros mecanismos.*

Recientemente, se ha postulado un nuevo mecanismo posible, que consiste en el colapso del campo eléctrico alrededor del segmento S4 (Bell y cols., 2004). En este caso, más que un desplazamiento del segmento S4, ocurriría

una redistribución de la caída del campo eléctrico producto del colapso de su entorno, lo que traería como consecuencia un cambio en la distancia eléctrica:  $\delta$ , a través de la cual viajan las cargas de compuerta.

En resumen, las pruebas disponibles no permiten la formulación de un modelo definitivo del movimiento del sensor de voltaje. Sin embargo, se ha abierto una intensa controversia acerca de los constituyentes estructurales del sensor de potencial y del papel que estarían jugando regiones que hasta antes del cristal de KvAP, no se consideraban parte del sensor como el segmento S3 y el lazo S3-S4.

La idea de esta tesis surge del razonamiento tanto el modelo de paleta como el de desplazamiento vertical o de rotación son correctos. Pero el modelo de paleta es específico para KvAP, que tiene un lazo S3-S4 muy corto y los otros modelos son aplicables a canales con segmentos largos como el de *Shaker* que consta de 31 residuos según Wallner y col. (1996). Sobre esta base se puede plantear que el objetivo general de esta tesis doctoral es **determinar el papel del lazo S3-S4 y parte del segmento S3, en la activación del canal de  $K^+$  *Shaker* a través de los siguientes objetivos específicos:**

- 1.- Establecer la relación entre la longitud del lazo S3-S4 y la flexibilidad de movimiento del sensor a través de parámetros cinéticos y en el equilibrio que caracterizan al canal *Shaker*
- 2.- Estudiar la relación entre naturaleza de los aminoácidos en lazo S3-S4 y la flexibilidad de movimiento del sensor, a través de parámetros cinéticos y en el equilibrio
- 3.- Establecer la relación entre la longitud del S3 y la flexibilidad de movimiento del sensor, a través de parámetros cinéticos y en el equilibrio.
4. Determinar el mínimo de aminoácidos presentes en el segmento S3, para lograr la apertura del canal *Shaker*.
5. Determinar los posibles componentes del sensor de voltaje del canal *Shaker*, a partir del modelo de paleta ó remo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. *Biología Molecular.*

#### 1.1. *Bacterias.*

##### 1.1.1. *Cepa bacteriana.*

La cepa bacteriana usada fue XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA USA) y se eligió de acuerdo a sus características genéticas recomendadas para amplificar las secuencias clonadas en el vector pBSTA (Promega Corp., Madison, WI USA).

##### 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 de crecimiento utilizado fue LB (Luria-Bertani) o Typ (Sambrook y col. 1989). Para los cultivos en medio sólido, se utilizó el medio líquido suplementado con agaragar al 1,5% (Sambrook y col. 1989). Todos los medios se esterilizaron a 125°C y 15 psi por 45 min.

### 1.1.3. *Obtención de bacterias competentes con cloruro de calcio.*

Las bacterias XL-1Blue se cultivaron en medio líquido LB tetraciclina (10 µg/ml) hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5 a 0,6 a 550 nm. Partiendo de un inóculo 1:100 crecido la noche anterior. Luego de sedimentarlas y resuspenderlas en una solución estéril y fría de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol 15%. Las bacterias se alicuotaron y congelaron en nitrógeno líquido, y posteriormente se guardaron a -80°C.

### 1.1.4. *Transformación de bacterias.*

Se agregó 0,75 µL de DMSO a 100 µL de suspensión de bacterias competentes manteniéndola en hielo durante 10 min. Se añadió entonces 1 o varios ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min, antes de someter a las bacterias a un calentamiento a 42°C durante 60 s. Luego de transferirlas al hielo por 2 min., las bacterias se crecieron durante 45 minutos en 0,8 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. Al medio estéril se le añadió el antibiótico a partir de soluciones concentradas mantenidas a 20°C bajo cero. La ampicilina se usó a una concentración final 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 de un cultivo de bacterias crecido durante toda la noche (12-16 horas) a 37°C, con agitación. La extracción se realizó haciendo pasar por columnas “mini” y “mini-spin” el DNA, según las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA).

## 1.4. *Purificación de ácidos nucleicos.*

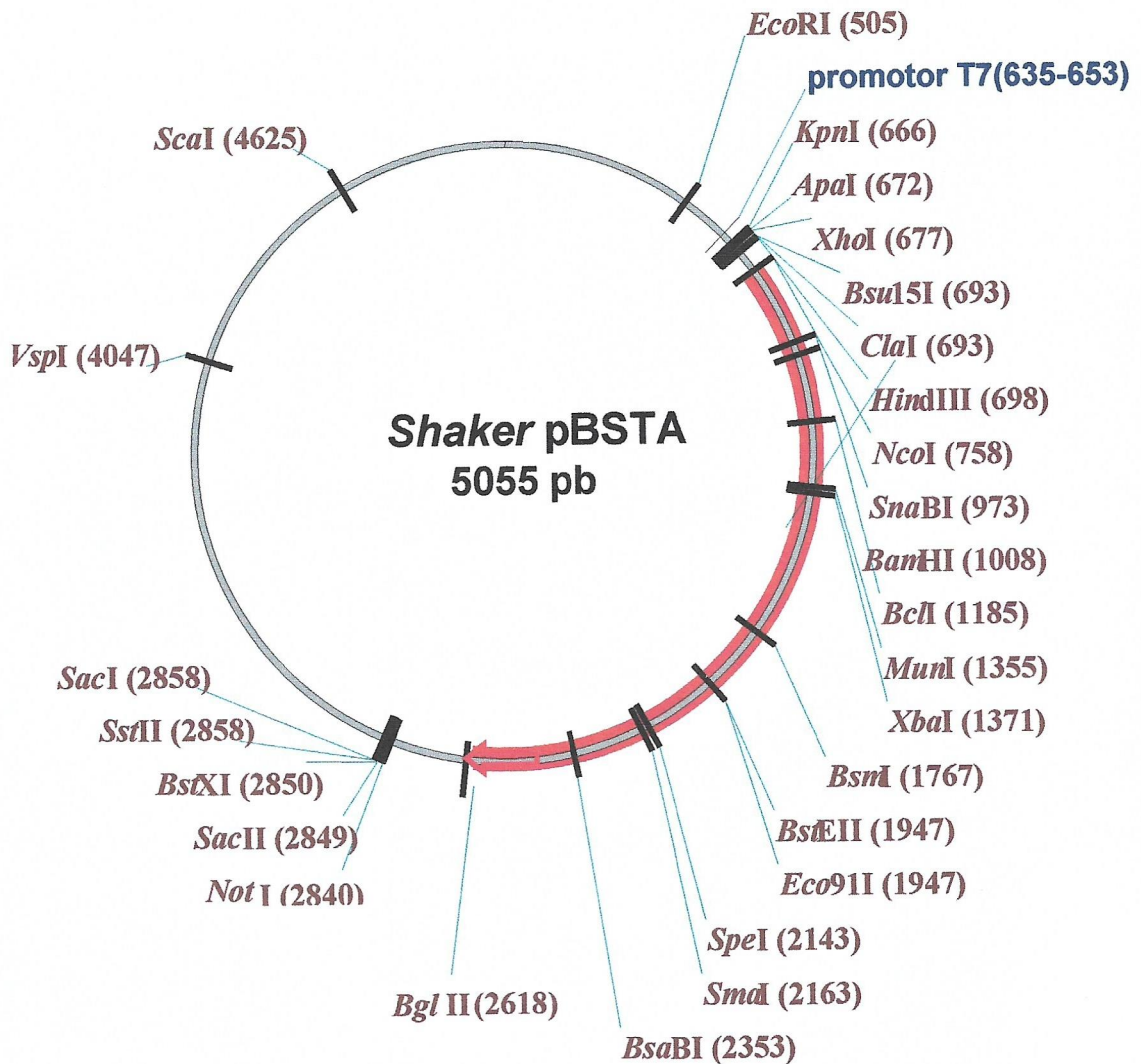
La purificación de DNA sometido a digestión enzimática u otro tratamiento, u ocasionalmente del RNA transcrito *in vitro*, se efectuó mediante una o más extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

(25:24:1 v/v), seguidas por una extracción cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y precipitando con acetato de sodio 0,3 M a pH ácido y 2,5 volúmenes de etanol. Luego de centrifugar los ácidos nucleicos en una micro-centrífuga por 15 minutos a 16000 g, el precipitado se lavó 2 veces con etanol 70%. La integridad del ácido nucleico se verificó según el patrón de migración electroforético 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 10 mM 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. Característica del clon utilizado.

Se utilizó el cDNA codificante de la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio *Shaker* H4 clonado de *Drosophila Melanogaster* (Schwarz y col, 1988) con la supresión de los aminoácidos 6 al 46 (*Shaker* H4  $\Delta$ 6-46), al cual me referiré en el futuro como canal control o silvestre. Este canal (*Shaker*) fue subclonado en el vector pBSTA y fue gentilmente donado por el Dr. Francisco Bezanilla de la Universidad de California (UCLA), USA. Este clon tiene un total de 5055 pares de bases, con un promotor T 7, en la región # (635- 653) (Fig 9).

Además, a ambos lados de la inserción del canal, hay una región de secuencias de  $\beta$ -globinas de *Xenopus laevis*, ubicada en el extremo 5`UT: # (703-748) y en el extremo 3`UT: # (2619-2821). Estas secuencias garantizan una mayor expresión heteróloga del canal en los oocitos del *Xenopus laevis*. El punto de inicio de la síntesis de proteína (*Shaker*) corresponde al # 759, inmediatamente después del sitio Kozak de unión a ribosomas y en el # 2604 está el codón de término de la síntesis.



**Figura 9.** Mapa de restricción del vector pBSTA con el inserto (canal *Shaker*). El DNA circular del plasmidio con el inserto se representa con línea gris. En rojo se destaca la secuencia del canal.

## 1.6. -Transcripción *in vitro*.

### 1.6.1. Linealización y purificación del DNA

Los plasmidios se linealizaron con una enzima de restricción de corte único *Not I* cuyo sitio se encuentra en el extremo 3' de la región a

transcribir. Se linealizaron 3  $\mu\text{g}$  de DNA según el protocolo recomendado para la enzima, en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción se incubó por una hora a 37°C. La linealización se verificó cargando 1  $\mu\text{l}$  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 5  $\mu\text{l}$  del agua libre de nucleasas del kit de transcripción mMMESSAGE mMACHINE (Ambion Inc., Austin, TX USA)

#### 1.6.2. Preparación del RNA mensajero

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 el vector pBSTA. Los reactivos se agregaron en el siguiente orden: 1  $\mu\text{l}$  del tampón de transcripción (10X), 5  $\mu\text{l}$  de NTP-Cap mix (ATP 15 mM, CTP 15 mM, UTP 15 mM, GTP 3 mM y Cap 12 mM), 0.5  $\mu\text{g}$  de DNA y 1  $\mu\text{l}$  de enzima (10X) en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ .

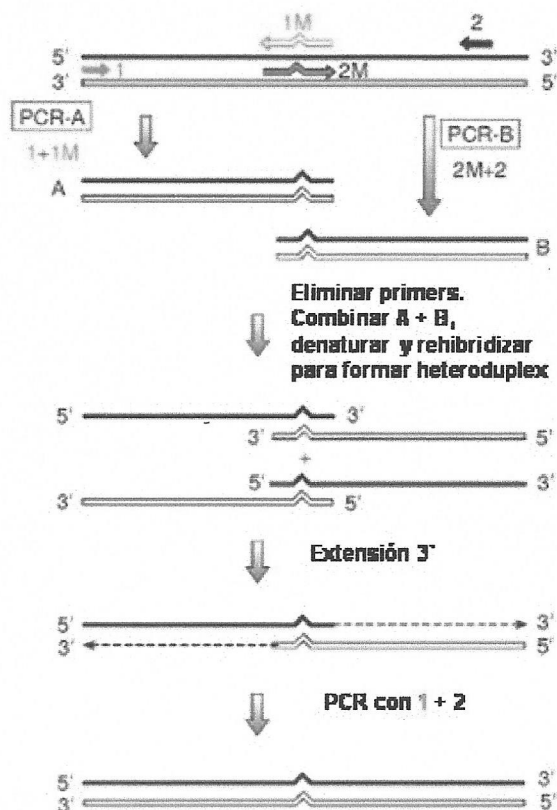
Esta mezcla se incubó una hora a 37°C. Para terminar la reacción, el DNA se digirió agregando 2 unidades de DNAsa Q1 e incubando por 15 min. a 37°C. Para precipitar el RNA se agregó 15  $\mu\text{l}$ . de agua y 12,5  $\mu\text{l}$ . de

cloruro de litio (LiCl 7,5 M, EDTA 75 mM) y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una hora antes de centrifugar el RNA precipitado. Finalmente se efectuó un lavado con etanol al 70% y se resuspendió el RNA en agua libre de RNAasas. 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  $\mu\text{g./ml}$ .

### 1.7. Mutagénesis por PCR: Mutaciones puntuales y eliminación selectiva de residuos aminoacídicos.

#### 1.7.1. Mutaciones puntuales

El procedimiento de mutagénesis por PCR está basado en la estrategia



**Figura 10. Procedimiento de mutagénesis por PCR.**

El sitio a mutar en el DNA se esquematiza con un doblez en las flechas y líneas ( $\Delta$ ). Este sitio está flanqueado por dos sitios de restricción únicos. En una reacción (PCR-A) el DNA molde se alinea con los oligonucleótidos 1 y 1M (mutagénico), y en la segunda reacción (PCR-B) se alinea con los oligonucleótidos 2 y 2M. Los fragmentos de PCR A y B se usan como DNA molde en la siguiente reacción para formar el heteroduplex, en conjunto con los partidores externos 1 y 2. Las hebras simples de los fragmentos A y B se superponen formando el heteroduplex como se esquematiza. Los partidores 1 y 2 generan el fragmento de interés, que contiene la mutación en ambas hebras (PCR con 1+2).



de “cuatro partidores” y es una modificación de los métodos de Horton y col. (1989) y Landt y col. (1990).

Un requisito del método es la presencia de 2 sitios únicos de restricción que flanquean la zona que se desea mutar. Se efectúan dos reacciones paralelas de PCR cuyo molde es el DNA a mutagenizar. En la reacción 1 (**PCR-A**) se usa un partidor mutagénico **1M** y un partidor externo universal **1**, es decir distal a la mutación y a uno de los sitios de restricción mencionados. Los partidores mutagénicos contienen los codones de la mutación que se quiere introducir y fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville City, IA, USA). En la reacción 2 (**PCR-B**) se usa un partidor mutagénico **2M**, que es parcialmente complementario al partidor **1M**, y un partidor externo universal, **2**. Los fragmentos generados en las reacciones **A** y **B**, contienen la mutación en ambas hebras, y se sobreponen parcialmente en los extremos que poseen la mutación. Estos fragmentos se purifican y se extienden en una tercera reacción de PCR en presencia de los partidores externos **1** y **2**. El fragmento generado está limitado por los extremos 5' de los partidores **1** y **2**, y posee la mutación en ambas hebras (Figura 10). Este fragmento se digirió con Xba I y Bsm I ó

Eco 91I. Esta “*cassette*” fue insertada en el clon de *Shaker* silvestre, previamente tratado con las mismas enzimas de restricción.

#### 1. 7. 2. *Eliminación selectiva de residuos aminoacídicos*

La estrategia es utilizar 2 oligonucleótidos que se hibridan a ambos lados de la secuencia a eliminar y que sintetizan las 2 hebras de DNA excluyendo el sector acotado por los oligonucleótidos. Al ligar este DNA, se deja afuera la secuencia que deseamos excluir.

#### 1.8. *Determinación de la Secuencia 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, USA) basado en el método de “terminación de la cadena por didesoxinucleótidos” (Sambrook y col. 1989). Los DNA de distinto largo marcados con dATP- $\alpha^{35}\text{S}$  (NEN, Boston, MA, USA) se separaron por electroforesis 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 (Tris, Borato, EDTA), en un total de 60 ml. La reacción de gelificación se catalizó con 90  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio 25% y 90  $\mu\text{l}$  de TEMED. La electroforesis se realizó a 55 Watts por 30 min, y luego 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 auto-radiografía.

En los últimos 4 años el proceso de secuenciación ha sido realizado por empresas nacionales (Oligopéptido, Genytec, ambas en Santiago) y extranjeras (Retrogen en USA y Medigenomix en Alemania).

## ***2. Animales de experimentación y microinyección.***

### *2.1. Ranas.*

Grupos de 7-15 ejemplares hembras de la especie *Xenopus laevis* provenientes de USA (NASCO, Modesto, CA, USA) se mantuvieron en bateas plásticas con 15 a 20 litros de agua potable a la cual se le extrajo el cloro, a una temperatura de 18°C y con obscuridad en forma continua. La extracción del cloro se realizó almacenando el agua en toneles de 100 litros y burbujeando aire durante dos a tres días. Las ranas fueron alimentadas dos veces por semana con alimento para anfibios (NASCO, Modesto, CA, USA).

## 2.2. Ovocitos.

Los ejemplares de *Xenopus laevis* se anestesiaron con hielo y mediante una incisión abdominal se disecaron uno o dos lóbulos ováricos. Estos últimos se transfirieron a solución OR-2, compuesta por 82,5 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 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 defolicular y aislar los oocitos, los lóbulos se cortaron en trozos pequeños y se incubaron en medio OR-2 con 2,5 mg/ml de colagenasa (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), equivalente a ~ 450 U/ml, por un periodo de 45 a 60 min., a temperatura ambiente y con una agitación orbital de 30 a 60 ciclos/min. Los ovocitos se lavaron 3 veces en medio OR-2 sin colagenasa y 2 veces en la solución ND-96 (96 mM de NaCl, 2mM de KCl, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de HEPES, pH 7,6). Posteriormente los ovocitos se colocaron en una placa de Petri con medio ND-96 suplementado con gentamicina (50 µg/ml) y se efectuó una primera selección de ovocitos de los estados V y VI. Los oocitos se mantuvieron a 18°C.

Doce a veinticuatro horas después del tratamiento con colagenasa, se efectuó la segunda selección de ovocitos, eligiéndose mediante inspección visual aquellos que no tuvieran la membrana de células foliculares. Estos ovocitos seleccionados se inyectaron durante las próximas 12 horas.

### *2.3. Expresión heteróloga de canales en ovocitos de *X. laevis*.*

#### *2.3.1. Procedimiento de microinyección.*

Se microinyectó 10 ng de RNA mensajero en un volumen de 50 nl. La microinyección se realizó con la ayuda de un sistema que consistió de una lupa binocular (Nikon, Tipo 2001), una fuente de luz con fibra óptica (“FO-Z”, Chiu Technical Corp.; Word Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), un microinyector (“A203XUVY”, 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 Instruments Co., Novato, CA, USA). La punta de la micropipeta se quebró con una pinza bajo el microscopio, con el objetivo de obtener puntas de un diámetro de ~ 20  $\mu\text{m}$ . Una extensión aproximada de un centímetro, 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  $\mu$ l de RNA mensajero, 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 ND-96. Esta placa tiene pegada al fondo una rejilla plástica que permite mantener a los ovocitos en una posición fija durante la microinyección. Los ovocitos se inyectaron inmediatamente.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron 1-4 días después de la microinyección. Durante este tiempo los oocitos microinyectados se mantuvieron a 18°C, en ND-96 suplementado con gentamicina. Previo a la realización de los experimentos de “patch-clamp”, se removió manualmente la membrana vitelina del ovocito.

### **3. *Electrofisiología***

#### **3.1. *Adquisición de los datos***

Para el registro de las corrientes se empleó el método de potencial controlado (“voltage-clamp”), en dos modalidades: i) “Patch-clamp” y ii) “Cut-open oocyte vaseline gap”.

### 3.1.1. Técnica de “patch-clamp”

#### 3.1.1.1. Pipeta de registro.

Para los experimentos de patch clamp se utilizó pipetas de vidrio de borosilicato Pyrex 9530-1 (Corning Inc., Corning City, NY, USA), obtenidas a partir del estiramiento con calor en un “puller” horizontal (modelo P80-PC, Sutter Instrument Co., San Rafael, CA, USA). Las pipetas utilizadas fueron de 10-70  $\mu\text{m}$  de diámetro con una resistencia entre 0,4-0,8 M $\Omega$ . Estas pipetas poseen un diámetro mayor que los habituales por eso los parches se llaman macro parches. 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 posterior a un lavado con etanol, cloroformo y agua potable.

#### 3.1.1.2. Soluciones de registro.

Para el registro de corrientes macroscópicas, el oocito se bañó con una solución de KMES 110 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7,2. Las pipetas de registro se llenaron con la misma solución. De esta manera el potencial de juntura entre las soluciones es cero y el potencial de inversión de la corriente de potasio también es cero.

### 3.1.1.3. Registro de corrientes macroscópicas.

El registro de las corrientes macroscópicas se realizó utilizando la técnica de “patch clamp” (Hamil y col., 1981) en configuración “cell-attached” en macroparches de membrana (Hilgemann, 1989)

### 3.1.1.4. Fundamentos teóricos de la técnica de Patch Clamp.

La técnica de “patch clamp” (Neher, 1992) permite registrar tanto corrientes de canal único como corrientes macroscópicas que son la suma de las corrientes que pasan a través de muchos canales. En esta técnica se usa como electrodo una pipeta de vidrio con un orificio del orden de  $1\ \mu\text{m}$  de diámetro. Ésta se acerca a la superficie celular y después de hacer contacto con ella, se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta lo que hace que parte de la superficie de la membrana se invagine en la pipeta. Esto es seguido por la unión de la membrana y la superficie del vidrio produciendo un sello de alta resistencia eléctrica (del orden de los  $\text{G}\Omega$ .) Este proceso permite un aislamiento perfecto entre la región de la membrana circunscrita por la pipeta y el resto de la membrana, haciendo posible un cambio de potencial de membrana sólo en dicha región.

La figura 11 muestra un diagrama esquemático que incluye los circuitos equivalentes de la pipeta y de la membrana de la célula y las conexiones básicas de la pipeta al amplificador. El potencial  $V_{com}$  aplicado a la entrada positiva del amplificador operacional aparece a la entrada negativa del mismo debido a la retroalimentación y a la alta ganancia del amplificador. Como resultado de esto, la pipeta, cuya resistencia es  $R_p$ , adquiere el potencial  $V_{com}$  y la corriente requerida para imponer este potencial, fluye a través de ella y por la membrana aislada por la pipeta. La corriente proviene de la salida del amplificador, a través de la resistencia de retroalimentación  $R_f$ . Por lo tanto, el  $V$  a la salida del amplificador está dado por:

$$V = -I_m R_f + V_{com} \tag{1.0}$$

El segundo amplificador es un amplificador diferencial de ganancia 1x. Su función será sustraer  $V_{com}$  con el objeto de obtener un voltaje propor-

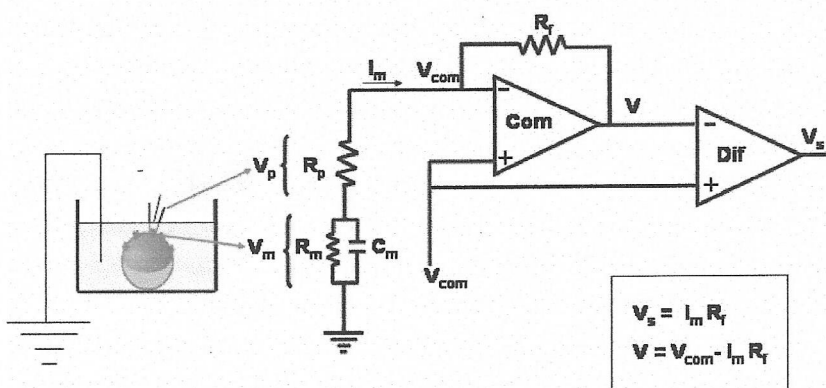


Figura 11. Esquema del circuito básico de amplificadores del equipo de “Patch-clamp” y del circuito equivalente formado por la pipeta y la membrana



cional a la corriente de membrana. De aquí que el voltaje de salida del segundo amplificador,  $V_s$  es:

$$V_s = I_m R_f \quad (2.0)$$

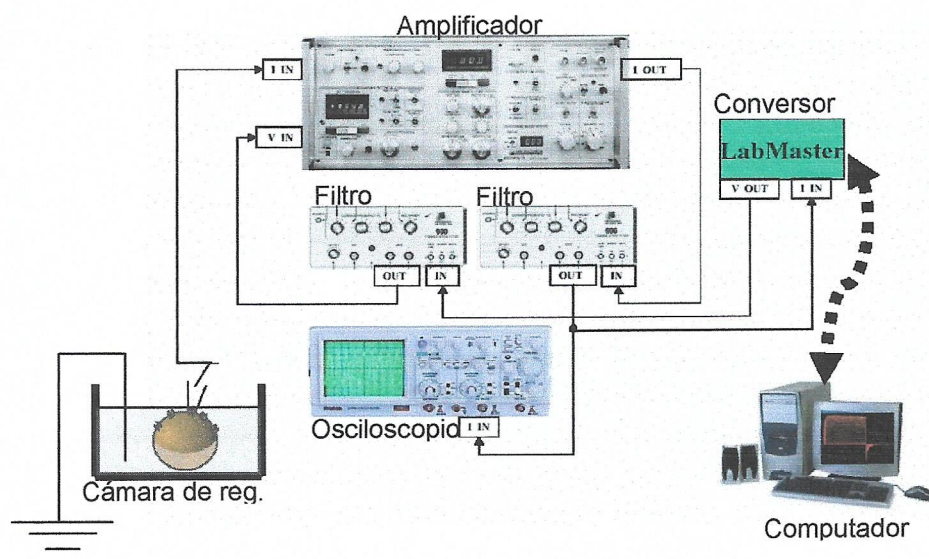


Figura 12. Esquema del sistema de registro para "Patch-clamp".

### 3.1.1.5. Componentes del sistema de registro.

El sistema de registro se esquematiza en la figura 12 y está formado por: una cámara donde se ubica el oocito, un amplificador de patch-clamp Axopatch-1D (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA), dos filtros Bessel, uno para la corriente y otro para el voltaje (Frequency Devices 900, Haverhill, MA, USA), un osciloscopio de dos canales modelo 6502 (Hung Chang Co. Ltd., Seúl, Corea), una tarjeta de adquisición LabMaster TL-1 de

100 KHz (Scientific Solution, Solon, OH, USA) y un computador basado en el procesador Pentium III (Intel Corp., Santa Clara, CA, USA).

La cámara de registro se montó sobre una mesa antivibratoria fabricada en el laboratorio y bajo una lupa binocular (WPI, Sarasota, FL, USA) con un rango de magnificación de 14 a 80 veces. La visualización del oocito fue facilitada por una fuente de luz con fibra óptica (FiberLite 180, Dolan Jener Industries Inc., Lawrence, MA, USA).

La posición y el desplazamiento de la pipeta de registro se controló con un micromanipulador compuesto por tres plataformas con tornillo micrométrico (Modelo 420, Newport Co., Fountain Valley, CA, USA) con desplazamiento en los ejes X e Y en el plano horizontal y con desplazamiento en el eje Z desviado 45° en relación al plano vertical. El desplazamiento en este eje se pudo controlar manualmente o con un motor (Modelo 861, Newport Co., Fountain Valley, CA, USA).

### **3.1.2. Técnica de “cut-open oocyte vaseline gap” (COOVC)**

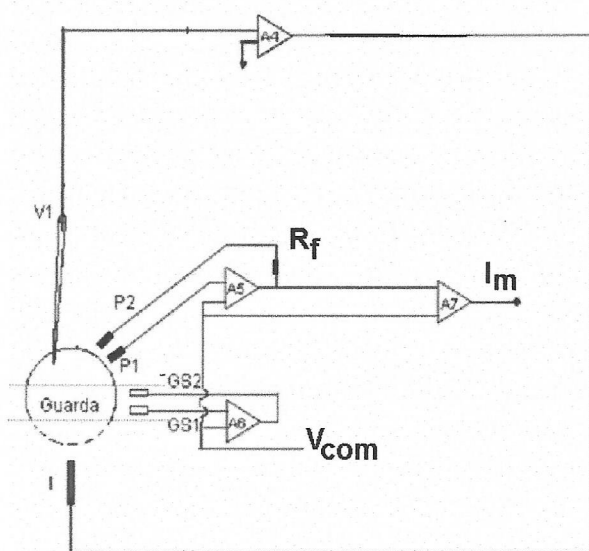
Una técnica alternativa de observar la corriente llevada por los canales en las membranas de ovocitos es la llamada “**cut-open oocyte vaseline gap**” COOVC. Esta técnica desarrollada por el Dr. Enrico Stefani

(Tagliatela y col., 1992)) y es una adaptación de la técnica de “vaseline gap voltage clamp” usada para el estudio de fibras musculares. (Hille y Campbell, 1976) Consiste hacer atravesar la célula a través de un sello aislante de vaselina. Con este sello se definen dos compartimientos extracelulares. La membrana que comunica con uno de estos compartimientos se permeabiliza haciendo que este compartimiento sea ahora intracelular. Teniendo acceso a ambos lados de la membrana se puede establecer un sistema de fijación de potencial. Para los experimentos de accesibilidad de los mutantes de cisteína se utilizó la técnica COOVG, para tener el lado extracelular disponible para la perfusión del reactivo MTSET. El sistema electrónico para hacer COOVG se fabrica actualmente por la firma Dagan, Somercity, USA.

#### 3.1.2.1. Sistema de registro

La cámara de registro para COOVG consta de tres compartimientos: dos extracelulares (de registro y de guardia) y uno intracelular (Figura 13), aislados por sellos de vaselina. Los tres compartimientos están bajo *voltage clamp* mediante sendos circuitos de realimentación negativa (Amplificadores operacionales A4, A5 y A6 de la fig 13). El voltaje de los

compartimientos superior o de registro y con el intermedio o guardia se llevan al potencial de comando mediante los amplificadores A5 y A6. Como ambos compartimientos están al mismo potencial eléctrico no hay flujo de corriente entre estas zonas. La caída de tensión producida en la resistencia  $R_f$  es proporcional a la intensidad de corriente que circula por la membrana que está en el compartimiento superior  $I_m$ . Este voltaje se recupera mediante el amplificador A7 que es un diferencial de ganancia 1x. El compartimiento inferior se mantiene a potencial cero mediante un circuito de realimentación que consiste en el microelectrodo V1, el amplificador A4 y el electrodo I. Para cerrar el lazo de realimentación negativa la membrana del oocito que está en la cámara inferior o



**Figura 13. Esquema simplificado del sistema de registro de COOVG mostrando los tres circuitos de fijación del potencial.** Las líneas punteadas representan los sellos de vaselina, que definen tres compartimientos. Los dos superiores son extracelulares y el inferior es intracelular. Los dos compartimientos extracelulares se fijan al voltaje del comando,  $V_{com}$ , mientras que el intracelular se fija a potencial cero. La caída de tensión producida en la resistencia  $R_f$  es proporcional a la resistencia de la membrana que está en el compartimiento superior.

intracelular se permeabiliza con saponina.

### 3.1.2.2. Electrodo

El electrodo de registro del potencial intracelular (V1) se obtuvo estirando un capilar de vidrio (WPI, 1B100F-4) mediante un estirador horizontal. Los microelectrodos así obtenidos se llenaron con 2.7 M NaMES, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0 y tuvieron una resistencia inferior a 0,8 MΩ.

Los otros electrodos se comunican con la cámara de registro mediante puentes de agaragar al 2% en NaCl 1M.

### 3.1.2.3. Soluciones de registro

Se bañó el oocito en una solución de KMES 110 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7,4 (solución extracelular). Las pipetas de registro se llenaron con una solución NaMES 2,7 mM, NaCl 10 mM, HEPES 10 mM pH 7,4. Como medio intracelular se utilizó KMES 110 mM, HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4 (solución intracelular).

La membrana del oocito que da al compartimiento inferior fue permeabilizada con solución intracelular a la que se le agregó saponina 0,1%.

### 3.2. *Adquisición y análisis de las corrientes macroscópicas*

#### 3.2.1. *Generalidades.*

Para la obtención de las corrientes macroscópicas se utilizaron dos tipos de protocolos: uno de pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y de duración adecuada para alcanzar el estado estacionario de las corrientes, y otro donde se aplicó una rampa de potencial lo suficientemente lenta como para registrar corrientes en estado cuasi estacionario.

La señal de corriente se adquirió en forma digital a razón de 500 a 4000 muestras por segundo con resolución de 12 bits, previamente filtrada con un filtro pasa bajos Bessel a una frecuencia igual a la quinta parte de la frecuencia de muestreo. La adquisición de los datos se realizó mediante el software PCLAMP 5.51 (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA).

Para el análisis de los datos se utilizó PCLAMP 6.0 (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA), ANALISYS PROGRAM BETA 2 (Desarrollado en



la Universidad de California, Los Angeles, USA) y Microsoft Excel 97 (Microsoft Co., Redmont, WA, USA).

### 3.2.2. Particularidades

#### a) Determinación de la conductancia macroscópica.

Para la obtención de la conductancia macroscópica del canal *Shaker* control y de todos los canales mutantes se utilizó un protocolo de pulsos de  $-90$  a  $+180$  mV con incrementos de 3 a 10 mV y seguido de un pulso de  $-60$  mV a  $-100$  mV. En este último pulso (conocido como pulso de cola) se tomaron isocronas de corrientes que permitieron determinar la conductancia máxima a partir de un ajuste de la curva G-V a una distribución de Boltzmann elevada a su cuarta potencia.

A diferencia de otros canales en que para el ajuste de la G-V se puede suponer un modelo de dos estados como el modelo más simple, en el caso de los canales de  $K^+$  tipo *Shaker*, el modelo más simplificado para el estado estacionario es uno en el cual la probabilidad de encontrar los canales abiertos está descrito por la ecuación:

$$P_o = G / G_{max} = \left[ \frac{1}{1 + e^{-(V - V_{1/2})zF/RT}} \right]^4 \quad (3.0)$$



donde  $z$  es el número equivalente de cargas de compuerta para cada sensor de potencial,  $V_{1/2}$  es el voltaje en el que se alcanza el 50% de los sensores activados,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$ , la temperatura absoluta.

*b) Determinación de la constante de activación.*

Utilizando el mismo protocolo de voltaje empleado para determinar la conductancia macroscópica se determinó la constante cinética para la activación de los canales ( $\tau_{act}$ ). Para ello se ajustaron los trazos de corriente obtenidos a voltajes muy superiores al  $V_{1/2}$ , a una monoexponencial según la ecuación:

$$I(t) = I_{max} \left[ 1 - e^{-(t-d)/\tau_{act}} \right] \quad (4.0)$$

donde,  $(t)$  es el tiempo,  $(d)$  es un retardo y  $\tau_{act}$  es la constante de tiempo para la activación.

*c) Cálculo del cambio de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) causado por las mutaciones.*

Para determinar el cambio de energía libre a partir del equilibrio ( $\Delta\Delta G^0$ ) se empleó el valor de  $V_{1/2}$  obtenido en la ecuación (3.0) (ver sección a) calculada a partir de la relación:

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta G^0_{mutant} - \Delta G^0_{control} = RT \ln(K_{0,mutante} / K_{0,control}) \quad (5.0)$$

donde,  $K_0 = \exp(zFV_{1/2}/RT)$  y  $\Delta G^0 = zFV_{1/2}$ , R, T y F se definieron como en la ecuación (3.0) (ver anexo II)

El cambio de energía libre a partir de las constantes cinéticas de activación ( $\Delta\Delta G^*$ ) fue obtenido a partir de la relación:

$$\Delta\Delta G^* = \Delta G^*_{mutant} - \Delta G^*_{control} = RT \ln(\tau_{act,mutante} / \tau_{act,control}) \quad (6.0)$$

donde las  $\tau_{act,mutante}$  y  $\tau_{act,control}$  son los valores de constantes de tiempo para la activación determinadas a 0mV (por extrapolación o intersección en los casos posibles) de las curvas  $\tau_{act}$ -V para los mutantes de delección y el *Shaker* control, respectivamente.

#### d) Análisis de la periodicidad

- Ajuste a una función seno del  $\Delta\Delta G$

Para la evaluación preliminar de la periodicidad se ajustaron los cambios de energía libre ( $\Delta\Delta G^0$  y  $\Delta\Delta G^*$ ), en función del número de aminoácidos, a una función trigonométrica de la forma:

$$\Delta\Delta G = a + b \sin(\theta n + \varphi) \quad (7.0)$$

Donde  $n$  es el número de aminoácidos remanentes en la región truncada de la proteína,  $\theta$  es la frecuencia angular relativa al número de aminoácidos en un período, y  $a$ ,  $b$  y  $\varphi$  son constantes.

- *Transformada de Fourier*

El método de transformada de Fourier fue empleado para evaluar el grado de periodicidad del cambio de la energía libre entre los estados cerrados y abiertos ( $\Delta\Delta G^0$ ), como en los cambios de la energía de activación ( $\Delta\Delta G^*$ ).

El espectro de poder de la transformada de Fourier,  $P(\omega)$ , está dada por la relación:

$$P(\omega) = [X(\omega)^2 + Y(\omega)^2] \quad (8.0)$$

donde  $X(\omega)^2 = \sum [(\Delta\Delta G^0_j - \langle \Delta\Delta G^0 \rangle) \sin(j \omega)]$  y  $Y(\omega)^2 = \sum [(\Delta\Delta G^0_j - \langle \Delta\Delta G^0 \rangle) \cos(j \omega)]$ . Donde  $\Delta\Delta G^0$  es el valor  $\Delta\Delta G^0$  para un mutante y  $\langle \Delta\Delta G^0 \rangle$  es el valor promedio de  $\Delta\Delta G^0$  para todos los mutantes de delección. (Cornette y col., 1987). La  $P(\omega)$  es una función de la frecuencia angular  $\omega$  y fue usada para calcular la periodicidad de  $\Delta\Delta G^0$  para las diferentes mutaciones.

Para evaluar el carácter  $\alpha$ -helicoidal del espectro de poder, el índice de  $\alpha$ -periodicidad ( $\alpha$ -PI) fue calculado como:

$$\alpha\text{-PI} = \frac{\int_{90^{\circ}}^{120^{\circ}} P(\omega) d(\omega)}{\int_{0^{\circ}}^{180^{\circ}} P(\omega) d(\omega)} \quad (9.0)$$

*Nota:* En el caso de hélices  $\alpha$  anfipáticas ideales, el pico o máximo del espectro de poder debería estar en los 100 grados ( $\omega$ ) y con un valor de  $\alpha$ -PI mayor a 2.

*e) Método de Pendiente límite.*

Para obtener la carga efectiva total ( $z\delta$ ) acoplada a la apertura de los canales se emplearon rampas de voltajes de  $-100$  a  $-20$  mV, a una rapidez de 1-2 mV/s. Las corrientes iónicas registradas durante estas rampas lentas de potencial, se promediaron (de 15 a 20 rampas) y se convirtieron en conductancia (G), dividiendo las corrientes por su fuerza motriz. En otras palabras, la diferencia entre el voltaje aplicado y potencial de equilibrio para  $K^+$ , ( $V-E_K$ ). De esta forma al normalizar la conductancia  $G/G_{max}$  y graficarla en función del potencial obtendríamos la misma relación G-V ó  $P_o-V$ , recordando que  $G/G_{max}=P_o$  (ver anexo II) sólo que con una mayor resolución de puntos en el intervalo de potencial estudiado con respecto a la G-V obtenidas en la sección anterior. Este intervalo de voltaje tiene que ser

lo suficientemente negativo o poco positivo, como llegar a valores de  $P_o$  del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ , de esta manera se garantiza poblar los estados cerrados más profundos y de esta manera coleccionar toda la carga asociada a la apertura (ver en mas detalles en el anexo II). Como se demuestra en el anexo II, para un canal con  $N$  estados, cuando  $P_o$  tiende a  $-\infty$ , la pendiente tiende a la suma de todas las cargas, en otras palabras:

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} P_o = K \exp(QVF/RT) \quad (10.0)$$

donde  $Q$  es la suma de todas las cargas que se mueven entre cerrados o la carga total para la apertura y  $K$  es la multiplicación de las constantes  $K_i$  de equilibrio ( $i = 1 \dots n$ ) que definen las transiciones desde el primer cerrado hasta el estado cerrado  $n$ .

Empleando la ecuación 10 y aplicando logaritmo natural obtenemos que  $\ln P_o = \ln K + (QVF/RT)$ , despejando la carga total y derivando con respecto a  $V$  nos queda la siguiente expresión (ver más detalles en el anexo II):

$$Q = z\delta = (RT/F)(d \ln(G/G_{\max})/d(V)) \quad (11.0)$$

donde,  $R$ ,  $F$  y  $T$  fueron definidas de igual manera que para la sección de la conductancia macroscópica.

f) *Análisis de varianza.*

Para estimar la máxima probabilidad de que los canales estén abiertos se aplicó un protocolo básico de voltaje que fue  $-90$  a  $+120$  mV seguido de un pulso de cola de  $-90$  mV y se repitió 256 veces. Tanto de la primera parte del pulso como del pulso de cola se tomaron  $N$  isocronas a fin de determinar la corrientes promedio para ese tiempo, y su correspondiente valor de varianza, a partir de la relación:

$$\sigma^2 = \frac{2}{M-1} \sum_1^M (y_i - \bar{y})^2 \quad (12.0)$$

donde  $y_i = \frac{1}{2}(x_i - x_{n-1})$  y  $(M)$  es el número de veces que se aplica el protocolo de voltaje,  $(x_i)$  y  $(x_{n-1})$  son pares de trazos de corrientes subsecuentes e  $(\bar{y})$  el promedio de los valores de  $y_i$ .

De esta manera se garantizó, no sobreestimar la varianza producto de cualquier fluctuación de la corriente.

Una vez obtenida la varianza para cada valor de corriente promedio, se ajustó a los datos de varianza versus corriente promedio la ecuación parabólica:

$$\sigma^2 = i \langle I \rangle - \langle I \rangle^2 / N \quad (13.0)$$



Donde ( $\sigma^2$ ) es la varianza de los 256 “hits” de corrientes inducidas por el protocolo anteriormente descrito,  $\langle I \rangle$  es el promedio de los 256 trazos de corriente.  $N$  e  $i$  son el número de canales y corriente unitaria, respectivamente, (ver anexo II), ellos constituyen los parámetros ajustables.

Por último si recordamos que corriente macroscópica esta dada por

$I = iN P_{o_{\max}}$ ,  $P_{o_{\max}}$  se puede calcular a través de la expresión:

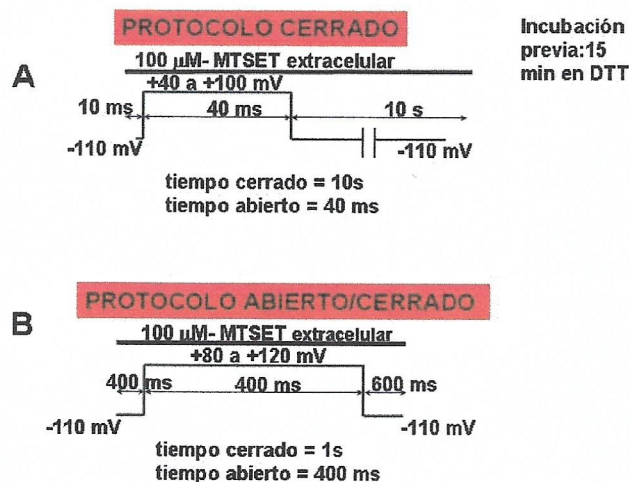
$$P_{o_{\max}} = I_{\max} / (iN) \quad (14.0)$$

#### 4. Experimentos con MTSET

Los experimentos de accesibilidad a MTSET fueron realizados por perfusión del reactivo por el lado extracelular y registro de los cambios de la corriente en el tiempo, mediante la técnica de “cut-open oocyte vaseline gap”.

La solución de MTSET fue preparada en el mismo momento de su utilización a una concentración de 4 mM en agua, y se diluyó en solución extracelular a una concentración de 100  $\mu$ M. En todos los experimentos de MTSET, los oocitos fueron preincubados en 100  $\mu$ M DTT por 10 min.

En el protocolo cerrado el canal se tiene a -110mV por 10 s y se abre a 40-100 mV por 40 ms. En el protocolo abierto/cerrado el canal de abre a



**Figura 14. Protocolos utilizados para los experimentos de accesibilidad con los mutantes de cisteína del canal *Shaker*.** A. Protocolo de despolarización en el cual el canal se mantiene cerrado la mayoría del tiempo. B. Protocolo de despolarización en el cual el canal se mantiene 1 s cerrado y 400 ms abierto.

80-120 mV por 400 ms y se mantiene cerrado a -110 mV por 1 s. El potencial de holding fue de -110 mV, tanto en el protocolo abierto como en el abierto/cerrado (Figura 14).

En todos los canales mutados con cisteínas la reacción con MTSET siguió un curso temporal

monoexponencial. Del ajuste exponencial se obtuvo la constante de velocidad de segundo orden ( $M^{-1}s^{-1}$ ) de la reacción entre el MTSET y los residuos de cisteínas, revelando el grado de exposición, a este reactivo, de este residuo aminoacídico en el canal, en sus dos configuraciones: abierto o cerrado.

El MTSET no modifica las características electrofisiológicas de los canales controles.

Solamente en los experimentos electrofisiológicos de accesibilidad se utilizó la técnica de “cut open oocyte vaseline gap”, en todos los demás fue utilizada la técnica de “patch-clamp”, por eso se abordó con más detalles en esta sección.

## **5. Análisis estadístico y modelación**

Los datos analizados fueron el promedio de 5 o más experimentos diferentes, con el reporte paralelo de sus desviaciones estándar, como la manera de reflejar las diferencias y similitudes de los parámetros. Los programas utilizados fueron: Clampfit 6.0 (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA) y Analysis (desarrollado en la UCLA, USA). Para generar el modelo molecular se utilizó el programa Deep View, antes llamado Swiss PdbViewer de la Glaxo-Smith-Kline, que es de uso público y está disponible en la página: [www.expasy.org/spdv](http://www.expasy.org/spdv).

Por último y como sugerencia del comité evaluador, en el anexo I, se adjuntan todas las publicaciones que originó este trabajo, a fin de esclarecer cualquier detalle que pueda ser omitido en esta sección o en las restantes secciones, que enriquezcan la lectura de este manuscrito y avalen su rigor científico.

## RESULTADOS

### 1. Repercusión de la longitud del lazo S3-S4 en la activación del canal *Shaker*

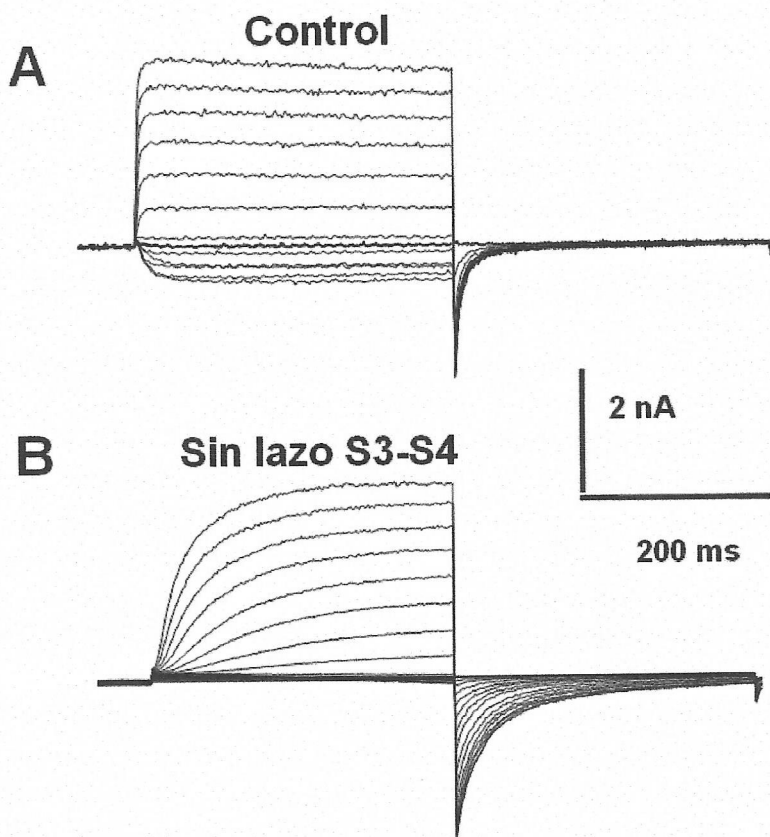
#### 1. 1. Generación del mutante sin lazo.

Los mutantes de supresión se generaron por PCR a partir del cDNA que codifica el canal de potasio *Shaker* H4, clonado de *Drosophila melanogaster*. (ver sección 1.7, Materiales y Métodos). En nuestro caso se usó un *Shaker* H4 al cual se le han suprimido los aminoácidos (aa) del 6 al 46 (*Shaker* H4  $\Delta(6-46)$ ). Estos aminoácidos conforman el dominio estructural que confiere el mecanismo de inactivación rápida en el canal.

Tomando como base este canal *Shaker* H4  $\Delta(6-46)$ , al cual nos referiremos en el futuro como *Shaker* H4  $\Delta$ , control o canal silvestre, generamos el mutante sin el lazo S3-S4: llamado 0aa, por no presentar ninguno de los 31 aminoácidos del lazo. La topología de 31 aminoácidos (aa) en el lazo S3-S4 es la propuesta para este canal por Wallner y colaboradores (1996).

## 1.2. Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal Shaker sin lazo S3-S4: 0aa.

Para caracterizar las propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal sin lazo, se midieron las corrientes macroscópicas bajo “*voltaje clamp*” usando un protocolo de despolarización de -70 a +120 mV con intervalos de 5 mV entre cada potencial y seguidos de un potencial de -70 mV, se generó un patrón de corrientes macroscópicas para el mutante 0aa y el control (Figura 15). Como se aprecia en esta figura al despolarizar, la corriente aumenta en forma sigmoidea en el tiempo a pesar de mantener constante el potencial eléctrico. Esto se debe a que la corriente macroscópica ( $I_m$ ) esta dada por la multiplicación del número de canales presentes en el parche estudiado ( $N$ ), la corriente pasa por cada canal (corriente unitaria,  $i$ ) y la probabilidad de que los canales se encuentren abiertos ( $P_o$ ). Esta última aumenta con el protocolo de despolarización, lo que se traduce en un paso de iones potasio a favor de su gradiente electroquímico. En estas condiciones experimentales, el gradiente sólo va a depender del potencial impuesto, pues el potencial de equilibrio del ión potasio es igual a 0, ya que la concentración externa de potasio es casi igual a la concentración interna (110 mM).



**Figura 15. Corrientes macroscópicas características de los canales *Shaker*.** Control (A) y del mutante 0aa (B), evocadas por un protocolo de despolarización de -70 a +120 mV con intervalos de 5 mV y seguidos por un potencial de -70 mV. El potencial de mantenimiento fue de -100 mV. Los parches se realizaron en configuración "cell-attached". Soluciones extracelulares, baño y pipeta contenían  $K^+$  110 mM.

Como el protocolo aplicado va desde -70 a -120 mV, a potenciales negativos, la corriente registrada es negativa o corriente de entrada y al pasar el 0mV la corrientes es positiva o de salida (Figura 15A y B). Al volver el potencial eléctrico a -70 mV, disminuye la probabilidad de encontrar los canales abiertos, en otras palabras los canales comienzan a



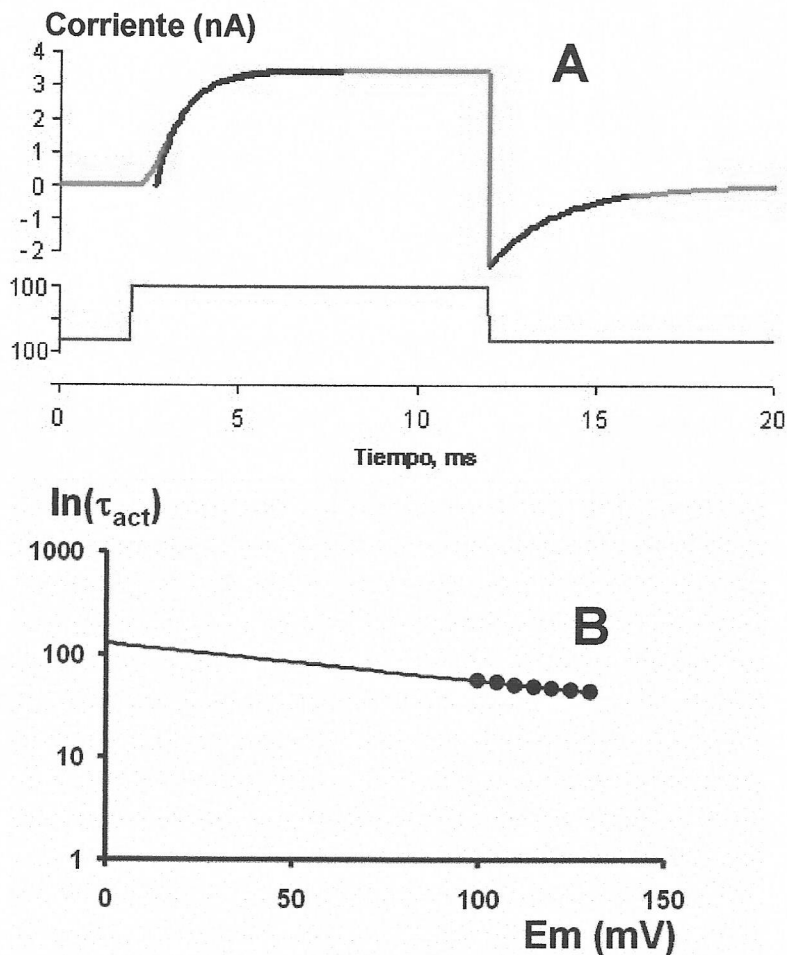
cerrarse con una determinada constante de tiempo pues al igual que la apertura este cierre y disminución de la corriente está mediada por el tiempo que toma la proteína-canal para pasar a su conformación no conductora. Si comparamos cualitativamente la cinética de activación para el mutante 0aa (Figura 15B) con respecto a la cinética del control podemos apreciar un claro enlentecimiento, tanto para la apertura como para el cierre de esta proteína sin lazo. Por otra parte, se detecta muy poca corriente de entrada para el mutante 0aa a potenciales negativos, en donde las corrientes macroscópicas del canal control son claras. De esta manera podemos inferir que para estos valores de potencial la probabilidad de que los canales estén abiertos para el mutante 0aa es muy baja, en otras palabras su curva de activación  $P_o-V$  ó  $G-V$  (ver sección 2, Anexo II), está más desplazada a la derecha con respecto a la curva  $G-V$  control. Una cuantificación de estas propiedades se muestra a continuación.



### 1.2.1 Propiedades cinéticas de la apertura y cierre para *0aa*.

Para cuantificar las constantes de activación del canal sin lazo se tomaron los trazos de corrientes macroscópicas obtenidos en el intervalo de voltaje en que la probabilidad de que todos los canales presentes en el parche estén abiertos ( $P_o$  casi 1) y se ajustaron a una monoexponencial (ecuación 8, Materiales y Métodos, Figura 16A). A este valor de  $P_o$ , se garantiza que la constante de tiempo para la activación calculada, en este intervalo de potencial, no esté contaminada con las constantes de vuelta o de desactivación que caracterizan el cierre del canal. El valor de la constante de tiempo de apertura para el canal sin lazo fue de 135 ms (Figura 16B), con un promedio de  $141 \pm 6.1$  ms (ver tabla II) con respecto a la constante de tiempo para la activación del canal silvestre que fue de  $3,2 \pm 0.8$  ms (ver tabla II). Los valores reportados de constantes cinéticas de activación fueron cuantificados en ausencia de potencial (a 0mV) para su comparación. Estas constantes de tiempo son el reflejo de la etapa o las etapas limitantes (Zagotta y col., 1994a). (Figura 16 y Tabla II). Si tomamos las constantes de activación para el mutante y el control a 0 mV (Tabla II) se puede calcular  $\tau_{mut}/\tau_{wt} = \exp(\Delta\Delta G^*/RT)$  entonces  $\Delta\Delta G^* = 2.2$  kcal/mol a 298K, siempre y cuando el mecanismo de

activación no haya cambiado sustancialmente, puesto que  $\Delta\Delta G^*$  representa la energía de activación del canal.



**Figura 16. Patrón de corriente para el cálculo de las constantes de tiempo de activación y desactivación.** A. El aumento de la corriente se debe a la activación de los canales. La constante de tiempo de activación se mide haciendo un ajuste de una función exponencial creciente a los puntos con una corriente superior al 50% de la asíntota, como se muestra en negro en la figura. Al volver a repolarizar la membrana la corriente decae a pesar de mantenerse constante el potencial eléctrico. Esto se debe a la desactivación de los canales. La constante de tiempo de activación se mide haciendo un ajuste de una función exponencial creciente, como se muestra en negro en el gráfico. B. Curva del logaritmo neperiano de las constantes de tiempo para la activación con respecto al intervalo de voltaje en que la  $P_o$  es casi 1 para el registro de la figura 15B. La extrapolación a 0 mV, para calcular la constante de activación fue de 130 ms. Este ejemplo constituye una representación del promedio obtenido para el mutante 0aa.

De esta manera podemos concluir que para alcanzar la energía de activación de la etapa o etapas limitantes en el caso del canal sin lazo se hace necesario suministrar 2 kcal/mol más con respecto a la del canal control.

Un análisis similar se realizó para calcular la constante de tiempo que refleja el cierre de la proteína canal. (Figura 16B). En este caso para poder construir el gráfico de constante de tiempo para la desactivación con respecto al voltaje, se parte de un potencial al cual todos los canales estaban abiertos y se repolarizó a diferentes valores de voltajes negativos, lo suficientemente negativos como para no contaminar esta constante con las constantes de ida o activación del canal. Esta constante refleja por tanto la transición del abierto al cerrado más cercano (ref). En el caso del mutante sin lazo fue de  $97 \pm 12$  ms con respecto a  $12 \pm 1$  ms. (tabla II). Una manera de reflejar la cantidad de energía necesaria para activar los sensores de voltaje en esta proteína es a través de una caracterización de su curva G-V.

## 1.2.2. Propiedades en el equilibrio para el mutante 0aa.

### 1.2.2.1. Dependencia de voltaje para la activación de 0aa: Curva

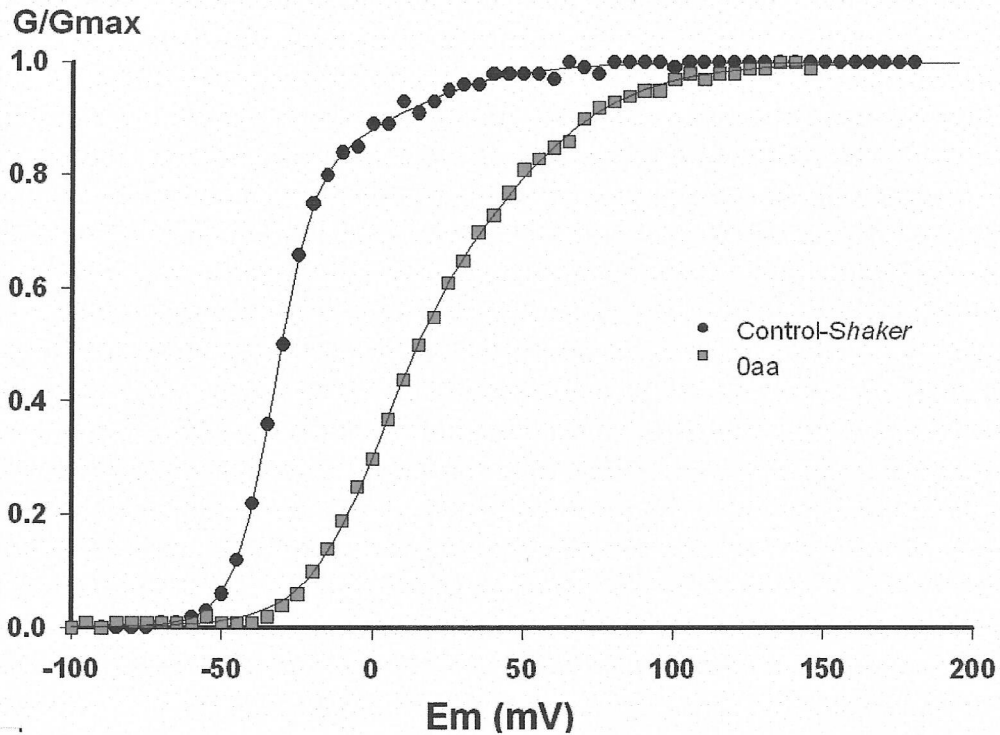
#### *G-V*

A partir del patrón de corriente macroscópica (Figura 15B), se determinó la curva *G-V* (ver sección 3.4.2 de Materiales y Métodos) y se ajustó a una ecuación de Boltzmann a la cuarta potencia (Figura 17), como reflejo de la cantidad de energía necesaria para activar los sensores de voltaje que favorecen la apertura de canal.

En el caso del mutante sin lazo, la curva *G-V* está desplazada en 40 mV a valores más positivos de potencial con respecto al control. Por lo tanto, la energía necesaria, por mol de subunidad, para activar los sensores de voltaje ( $\Delta\Delta G^o = -F(z_{mut}V_{1/2mut} - z_{wt}V_{1/2wt})$ , Anexo II) de la proteína mutante es 1,7 kcal/mol mayor que la del control.

En otras palabras, son necesarias 2 kcal/mol para lograr mover los sensores de voltaje en el canal sin lazo y lograr la apertura del canal.

El ajuste a una ecuación de Boltzmann a la cuarta potencia de la curva *G-V*, se debe a que es el modelo cinético más sencillo para el canal *Shaker*.



**Figura 17.** Curvas  $G-V$  para el canal *Shaker* control y para el mutante *Oaa*. Esta relación fue obtenida a partir de las corrientes macroscópicas mostradas en la figura 15. Los datos se ajustaron a una ecuación de Boltzmann elevada a la cuarta potencia como se describe en Materiales y Métodos.

Estas transiciones que son poco o totalmente independientes del voltaje, en el caso de esta proteína canal son la determinante de la probabilidad máxima de encontrar los canales abiertos ( $P_{o,max}$ ). La pregunta que se responde a continuación es si esta(s) transición(es) son afectadas o no por la eliminación del lazo S3-S4.

#### 1.2.2.2. Cálculo de la $P_{o,max}$ a través de análisis de varianza para 0aa.

Para el cálculo de la máxima probabilidad de encontrar los canales abiertos, se utilizó el método de análisis de varianza del ruido no estacionario, producto de la transición de un estado no permisible o cerrado del canal a un estado permisible o abierto (ver sección 3.4.2 f, Materiales y Métodos y sección 4 de Anexo II). En la figura 18A y B, se muestran los cursos temporales de la corriente promedio para un pulso de +120 mV y su correspondiente varianza para el mutante 0aa. Como se aprecia en la figura 17B el curso temporal de la varianza es bifásico que es reflejo de la probabilidad de encontrar el canal abierto durante su activación. El gráfico de varianza versus corriente promedio (Fig. 18C) fue ajustado a la ecuación  $\sigma^2 = iI - I^2/N$  donde  $i$  es la corriente unitaria,  $I$  la corriente promedio y  $N$  el número de canales presentes en la membrana (ver Materiales y Métodos y Anexo II). El gráfico describe un comportamiento parabólico a partir del cual se determinó un número de 20920 canales, una corriente unitaria de 0,8 pA y una probabilidad máxima de encontrar el canal abierto de 0,73.



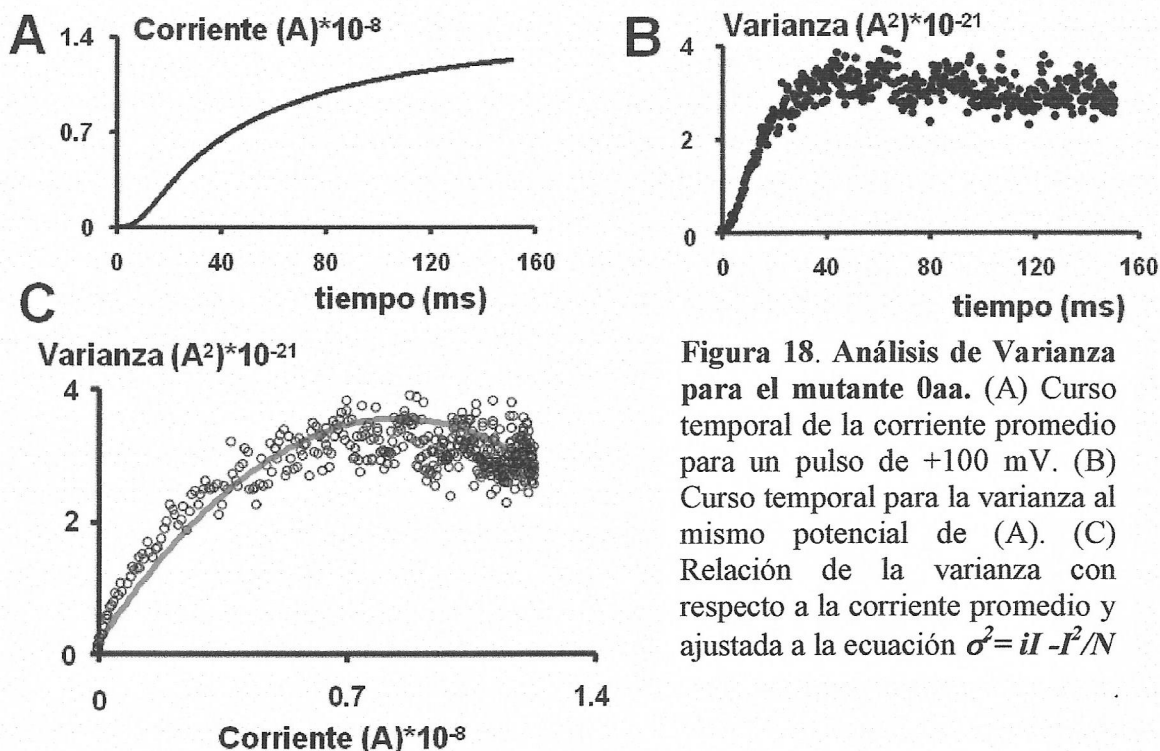


Figura 18. Análisis de Varianza para el mutante 0aa. (A) Curso temporal de la corriente promedio para un pulso de +100 mV. (B) Curso temporal para la varianza al mismo potencial de (A). (C) Relación de la varianza con respecto a la corriente promedio y ajustada a la ecuación  $\sigma^2 = iI - I^2/N$

Si dividimos la corriente unitaria, 0,8 pA, por el voltaje aplicado 100 mV, obtenemos un valor de conductancia de 8 pS, en el canal sin lazo S3-S4. Este valor es muy similar a la conductancia 10 pS reportadas para el canal *Shaker* control (Hille, 2001).

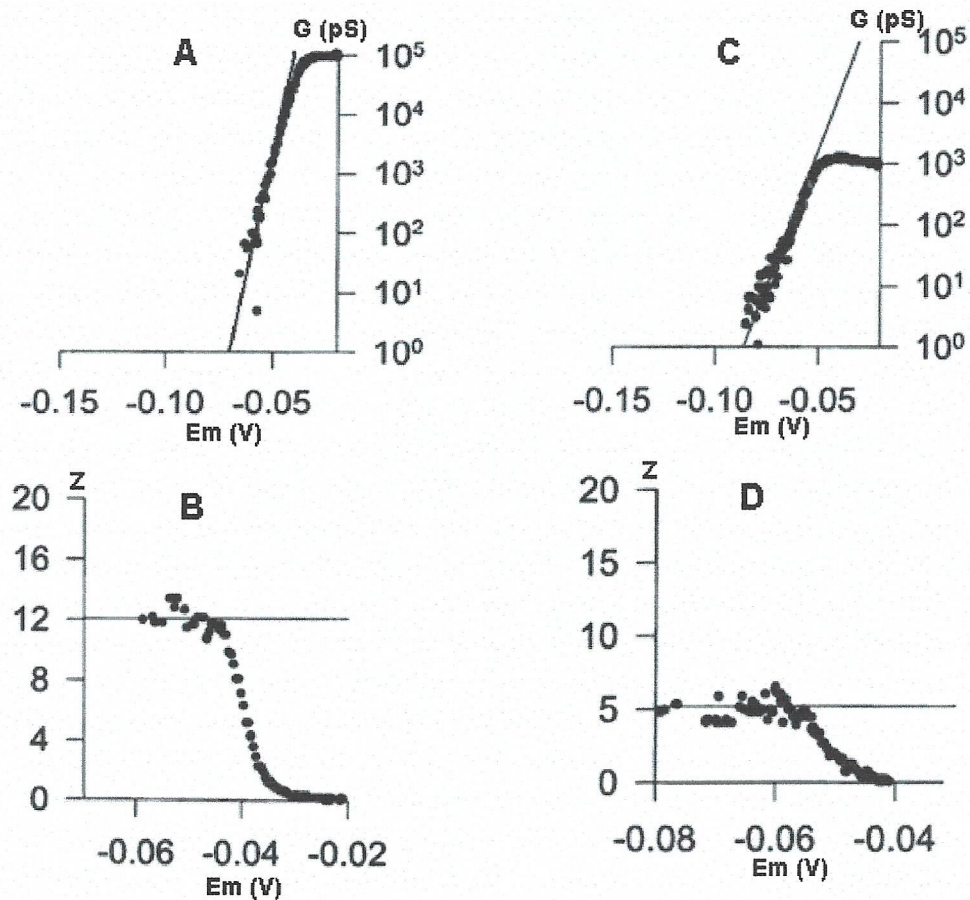
El valor promedio de  $P_{o,max}$  para 5 experimentos resultó ser  $0,74 \pm 0,04$ . El máximo de probabilidad de apertura para el canal *Shaker* silvestre está en el intervalo de 0,73 a 0,79 (Schoppa y cols., 1992; Nocetti y cols., 1996; Seoh y cols., 1996). Por lo tanto la supresión total del lazo S3-S4 no afecta la  $P_{o,max}$ . A diferencia de otros canales, en el canal *Shaker* no se puede obtener una  $P_{o,max}=1$ , esto se debe a que la última

etapa de transición de cerrado a abierto no es dependiente de potencial por lo que el valor máximo calculado no llegará al 100% de canales abiertos.

### 1.2.2.3. *Determinación de la carga de compuerta, a través del método de la pendiente límite para el mutante 0aa.*

Como se mostró en la Figura 17, la pendiente de la curva  $G-V$  para el mutante sin lazo disminuye respecto al control, sugiriendo una probable disminución de la carga de compuerta. Ya que la carga calculada a partir de las corrientes macroscópicas no es el total de cargas de compuerta, entonces recurrimos al método de **pendiente límite**, que permite reclutar el total de la carga de compuerta asociada a la apertura. (Sigg y Bezanilla, 1997; ecuación 11 de Materiales y Métodos y ecuación 3.8.A en Anexo II). Con rampas muy lentas de despolarización (1,2 mV/s) se obtuvieron las relaciones  $G-V$  a probabilidades muy bajas de apertura para el control y el mutante sin lazo, Figuras 19A y B, respectivamente. Al comparar dichas figuras es clara una disminución en la pendiente de la relación  $G-V$  para el mutante de 0aa con respecto al control y esto se refleja en una disminución de la carga de compuerta asociada a la

apertura para el mutante sin lazo ( $z\delta=5,2$ , Figura 19D) con respecto a la  $z\delta=12,1$  para el canal control (Figura 19C).



**Figura 19. Análisis de pendiente límite para el canal *shaker*.** Control (A y C) y para el mutante 0aa (B y D). En A y B se muestran los gráficos semilogarítmicos para la relación G v/s V. La línea indica el ajuste de los datos para determinar el valor límite de z. En C y D se muestra el gráfico z v/s V. La línea indica el valor asintótico de z a potenciales muy hiperpolarizantes obtenidos de la derivada con respecto al voltaje del ajuste monoexponencial de los datos a probabilidades muy bajas.

Si el movimiento del segmento S4 (sensor de voltaje), está restringido por la longitud del lazo S3-S4 es esperable una disminución del producto  $z\delta$ : que es la suma de las cargas de compuerta multiplicadas por su desplazamiento en el campo eléctrico. A partir de este razonamiento y siguiendo la secuencia aminoacídica que tiene la proteína, se generaron canales con diferentes longitudes del lazo, alargándolo desde el extremo C-terminal hacia el N-terminal. La pregunta a responder fue: ¿Cuál es la longitud mínima de lazo S3-S4, que permite recobrar el mismo patrón de propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal control?

Tomando como base la experiencia de la mutación sin lazo S3-S4: mutante 0aa, se alargó hacia el C-terminal, generando mutantes que tienen desde 1aa hasta 10aa en el lazo. Los mutantes fueron nombrados a partir de estas características como: 1aa, 2aa, 3aa, 4aa, 5aa, 6aa, 7aa, 8aa y 10aa. (Tabla I).

**Tabla I. Mutantes de supresión en la región S3-S4 del canal *Shaker* hacia N-terminal de la proteína.**

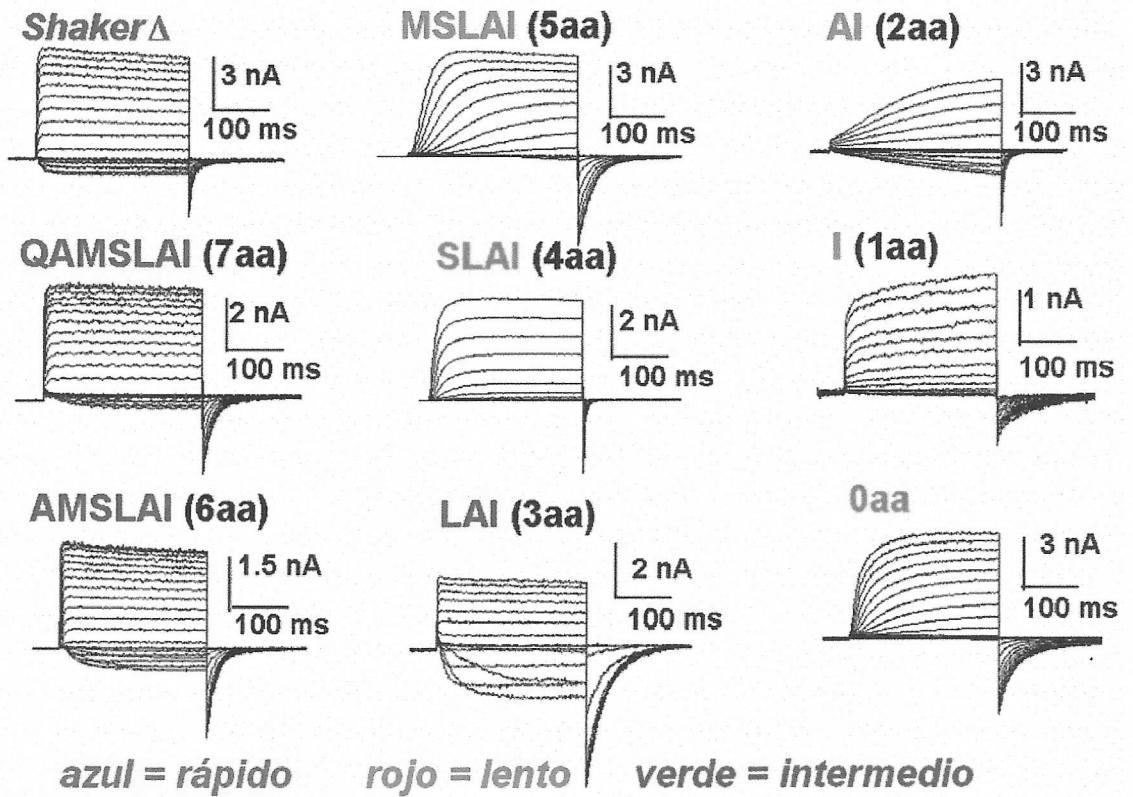
| Mutantes de delec.                                  | Nombre     | aa |
|---|------------|----|
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-360) | 0aa        | 0  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-359) | I          | 1  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-358) | AI         | 2  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-357) | LAI        | 3  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-356) | SLAI       | 4  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-355) | MSLAI      | 5  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-354) | AMSLAI     | 6  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-353) | QAMSLAI    | 7  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-353) | NQAMSLAI   | 8  |
| <i>Shaker</i> H4 $\Delta$ (6-46) $\Delta$ (330-353) | SSNQAMSLAI | 10 |

La mutación *Shaker*  $\Delta$ (6-46)  $\Delta$ (330-360) carece de todos los residuos que componen el lazo S3-S4 según Wallner y colaboradores (1996), por eso se le nombró 0aa. Las otras mutaciones tienen uno o más residuos que corresponden al extremo C-terminal del lazo. La segunda columna de esta tabla identifica estos residuos usando la abreviatura de una letra. La última columna indica las longitudes del lazo S3-S4 medida en cantidad de residuos.

### 1.3. Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal *Shaker* con diferentes longitudes de lazo S3-S4: *Supresiones hechas conservando parte del extremo C-terminal del lazo.*

En la Figura 20 se muestran las corrientes macroscópicas para los mutantes en los que se ha conservado desde 0 a 7 residuos (QAMSLAI) en el lazo S3-S4.





**Figura 20.** Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de delección en oocitos de *Xenopus laevis*. El potencial de mantenimiento fue -100 mV, y la membrana fue estimulada por voltajes entre -100 y +125 mV con incrementos de 10 mV seguidos de un pulso a -60 mV. Los nombres de las mutaciones de constantes cinéticas de activación más lentas que el control se destacaron en rojo, en verde los intermedios y en azul los de cinética de activación muy similar al control.

Una mirada cualitativa de esta figura permite concluir que no existe una correspondencia clara entre la longitud del lazo y la velocidad con que se activan las corrientes. Notamos, por ejemplo, que el mutante que tiene 2 aminoácidos en el lazo es mucho más lento que el mutante sin lazo ó el mutante con un lazo de 3aa es mucho más rápido en cuanto a su

constante de activación cuando se lo compara con un mutante con un lazo más largo, como es el mutante MSLAI (con 5aa en el lazo).

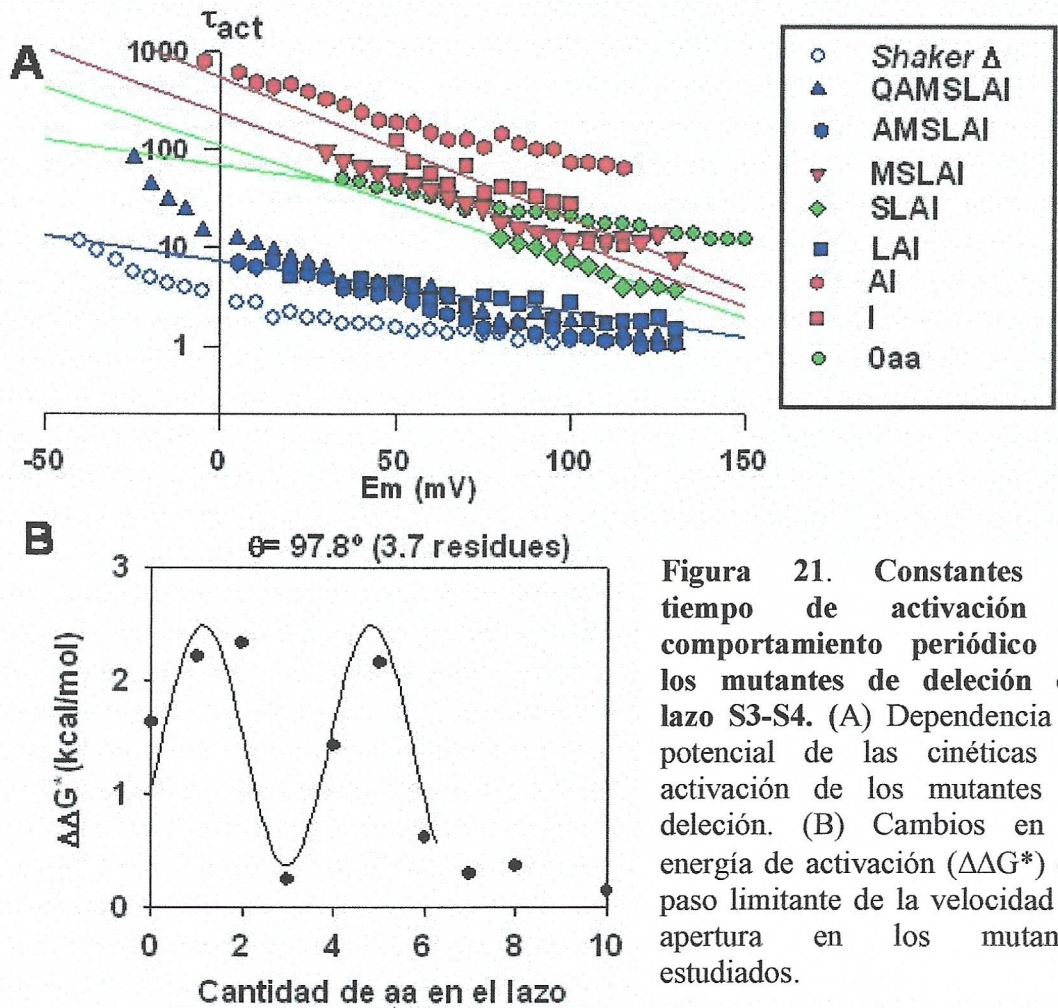


Figura 21. Constantes de tiempo de activación y comportamiento periódico en los mutantes de delección del lazo S3-S4. (A) Dependencia de potencial de las cinéticas de activación de los mutantes de delección. (B) Cambios en la energía de activación ( $\Delta\Delta G^*$ ) del paso limitante de la velocidad de apertura en los mutantes estudiados.



**Tabla II: Propiedades cinéticas y en el equilibrio de los mutantes estudiados**

|   |                                     | $\tau_{act}(0)^*$ (ms) | $\tau_{deact}(0)$ (ms) | $V_{1/2}^\dagger$ (mV) | $z\delta^\dagger$ | $N$ |
|---|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-----|
| Shaker $\Delta$                               | VVAEEEDTLNLPKAPV<br>SPQDKSSNQAMSLAI | 3.2 $\pm$ 0.8          | 12.1 $\pm$ 1.3         | -52 $\pm$ 9            | 1.9 $\pm$ 0.9     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-360)               | NINGUNO                             | 141.0 $\pm$ 6.1        | 96.7 $\pm$ 11.7        | -28 $\pm$ 3            | 0.9 $\pm$ 0.1     | 10  |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-359)               | I                                   | 535.1 $\pm$ 9.2        | —                      | -7 $\pm$ 1             | 0.8 $\pm$ 0.1     | 6   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-358)               | AI                                  | 692.1 $\pm$ 107.0      | 22.7 $\pm$ 8.2         | -46 $\pm$ 11           | 2.1 $\pm$ 0.9     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-357)               | LAI                                 | 5.7 $\pm$ 0.1          | 161.6 $\pm$ 15.4       | -41 $\pm$ 9            | 1.6 $\pm$ 0.9     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-356)               | SLAI                                | 89.1 $\pm$ 2.1         | 8.3 $\pm$ 1.1          | 7 $\pm$ 2              | 1.7 $\pm$ 0.7     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-355)               | MSLAI                               | 458.9 $\pm$ 9.8        | 80.9 $\pm$ 10.7        | -23 $\pm$ 5            | 1.7 $\pm$ 1.0     | 7   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-354)               | AMSLAI                              | 13.2 $\pm$ 1.9         | 29.5 $\pm$ 8.9         | -39 $\pm$ 9            | 2.8 $\pm$ 1.0     | 10  |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-353)               | QAMSLAI                             | 6.4 $\pm$ 0.5          | 120.0 $\pm$ 48.4       | -25 $\pm$ 7            | 2.8 $\pm$ 1.1     | 6   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-352)               | NQAMSLAI                            | 7.5 $\pm$ 2.5          | 42.0 $\pm$ 6.6         | -23 $\pm$ 7            | 4.2 $\pm$ 1.1     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-350)               | SSNQAMSLAI                          | 4.5 $\pm$ 0.3          | 49.6 $\pm$ 6.9         | -46 $\pm$ 8            | 2.3 $\pm$ 0.8     | 10  |
| Shaker $\Delta\Delta$ (331-360)               | V                                   | 23.8 $\pm$ 0.3         | 76.2 $\pm$ 7.8         | 38 $\pm$ 10            | 2.9 $\pm$ 1.0     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332-360)               | VV                                  | 3.3 $\pm$ 0.2          | 13.1 $\pm$ 0.9         | -40 $\pm$ 8            | 1.4 $\pm$ 0.9     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (333-360)               | VVA                                 | 22.9 $\pm$ 8.0         | 220.0 $\pm$ 66.3       | -77 $\pm$ 7            | 3.4 $\pm$ 1.0     | 6   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332-357)               | VVLAI                               | 44.1 $\pm$ 1.2         | —                      | 46 $\pm$ 7             | 1.2 $\pm$ 0.2     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330-355)<br>A359V1360V | MSLVV                               | 1,484.0 $\pm$ 311.1    | —                      | -2 $\pm$ 1             | 1.2 $\pm$ 0.2     | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332-355)               | VVMSLAI                             | 13.4 $\pm$ 1.4         | —                      | -42 $\pm$ 5            | 2.6 $\pm$ 0.5     | 5   |

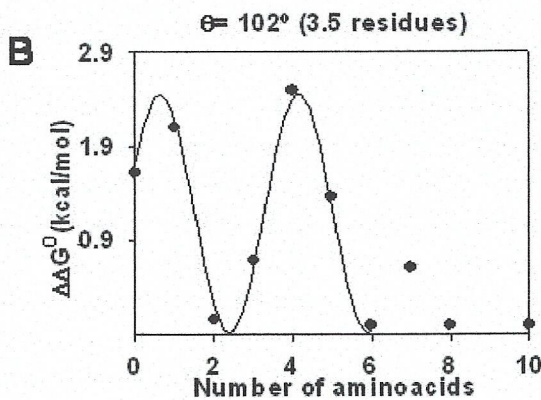
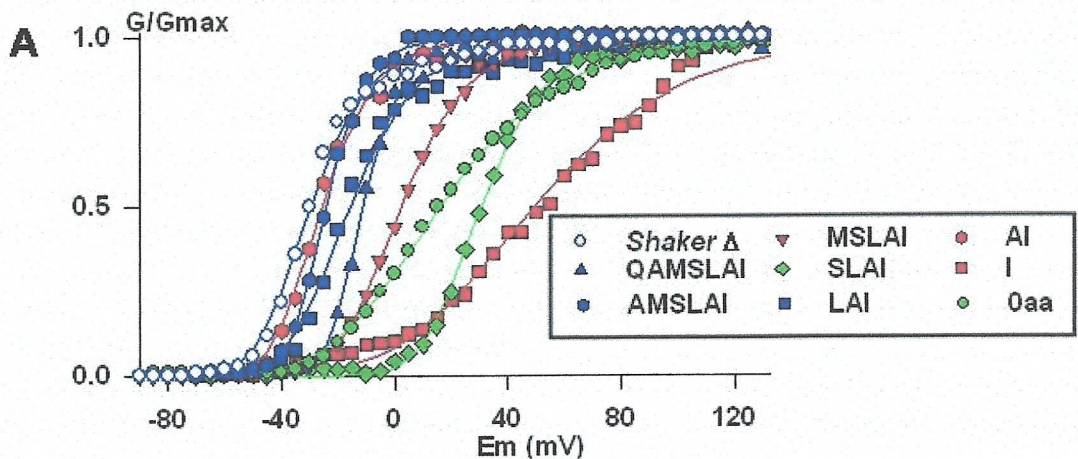
\*Las constantes de activación ( $\tau_{act}$ ) a 0 mV se obtuvieron por interpolación simple de los datos de  $\tau_{act}$  vs voltaje para los casos en que las mediciones de  $\tau_{act}$  pudieron hacerse a potenciales negativos y positivos. Para aquéllos en que los  $V_{1/2}$  estuvieron por encima de 0 mV las  $\tau_{act}$  se calcularon por extrapolación.

† Los parámetros se calcularon por ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann a la cuarta potencia (ver ecuación 3.0 sección 3.4.2., Materiales y Métodos).

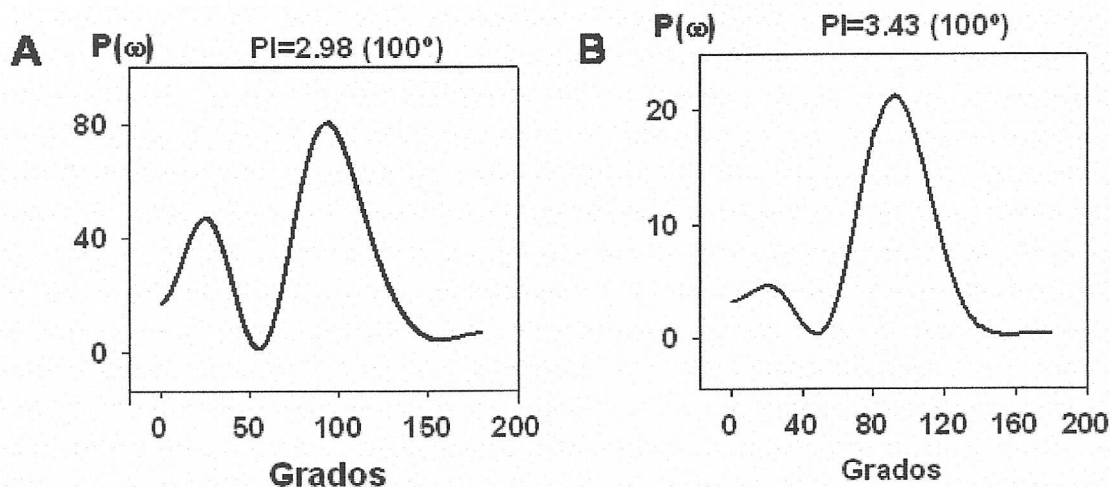
$N$  es el número de diferentes parches usados para medir las corrientes macroscópicas inducidas por los canales *Shaker* control y los mutantes.

Si cuantificamos las constantes de activación (Tabla II y Figura 21A) y establecemos una correspondencia entre la cantidad de aminoácidos en el lazo y el valor de constante de tiempo a 0 mV, sorprendentemente podemos establecer una periodicidad (Figura 21B). En la figura 20B se

muestra la diferencia de la energía de activación para la apertura de los canales mutante y el control, calculada de la razón de las constantes de tiempo  $\tau_{mut}/\tau_{wt} = \exp(\Delta\Delta G^*/RT)$  que puede describir la energía de activación en función del número de residuos en el lazo,  $n$ , como:  $\Delta\Delta G^* = A + B(\cos(\theta n + \psi))$  donde  $A$ ,  $B$  y  $\psi$  son constantes arbitrarias y  $\theta$  es la frecuencia angular expresada en grados por residuo. Se determinó que la frecuencia angular es de 98 grados por residuo.



**Figura 22. Dependencia de potencial y comportamiento periódico inducido por las deleciones del lazo S3-S4. A.** Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por las deleciones del lazo S3-S4. Cada punto es el promedio de 5 a 10 parches de membrana diferentes. Los puntos fueron ajustados a una ecuación de Boltzmann elevada a la cuarta potencia como se describe en materiales y métodos. **B.** Distribución de las perturbaciones en energía libre ( $\Delta\Delta G^{\circ}$ ) calculadas usando la ecuación  $\Delta\Delta G^{\circ} = -F(z_{mut}V_{1/2mut} - z_{wt}V_{1/wt})$ .



**Figura 23. Análisis de Fourier para las constantes de tiempo y  $V_{1/2}$  de los mutantes de delección del lazo S3-S4.** Espectro de poder para los valores de  $\Delta\Delta G^*$  (A) y  $\Delta\Delta G^\circ$  (B) para los mutantes de delección. Los espectros se calcularon usando las ecuaciones 8 y 9 como se describe en la sección 3.4.2. de Materiales y Métodos.

Esta frecuencia angular implica un período de 3.7 aminoácidos por vuelta. Similar análisis se realizó para diferencias de energía libre entre el estado abierto y el cerrado a 0 mV calculadas de los valores de las  $V_{1/2}$  obtenidas a partir del ajuste a una ecuación de Boltzmann a la cuarta potencia y obteniendo resultados muy similares (figuras 22 A y B).

El ángulo obtenido al ajustar la función sinusoidal (ver ecuación 7, sección 3.4.2. de en Materiales y Métodos) a los valores de cambios de energía libre para las  $V_{1/2}$  fue de 102 grados, para un período de 3.5 aminoácidos por revolución. Esta periodicidad obtenida tanto para las constantes de activación como para las  $V_{1/2}$ , son consistentes con una estructura secundaria helicoidal. Como ya se mencionó en Materiales y

Métodos, en el caso de hélices  $\alpha$  anfipáticas ideales, el pico o máximo del espectro de poder debería estar en los 100 grados ( $\omega$ ) y con un valor de  $\alpha$ -PI mayor a 2.

Los espectros de poder de las transformadas de Fourier (típico análisis para estructuras helicoidales) reflejaron un pico alrededor de los 100 grados para ambas: constante de activación y  $V_{1/2}$  con un índice de periodicidad para  $\alpha$ -hélices de 2,98 y 3,43, respectivamente (Figura 23).

Una  $\alpha$  hélice ideal debería dar un pico en el espectro de poder cuando el ángulo tiene un valor de  $100^\circ$ . Valores para el índice de periodicidad  $>2$  indican la presencia de una estructura con características de  $\alpha$ -hélice.

Por otra parte, al establecer una relación entre la cantidad de aminoácidos presentes en el lazo S3-S4 y las constantes de desactivación no se encontró ninguna regularidad, ni periódica ni lineal, en cuanto a la relación entre estos dos parámetros.

1.4. Cálculo de la  $P_o$  max y carga de compuerta a través del análisis y método de pendiente límite del canal Shaker con diferentes longitudes de lazo S3-S4: Supresiones hechas conservando parte del extremo C-terminal del lazo..

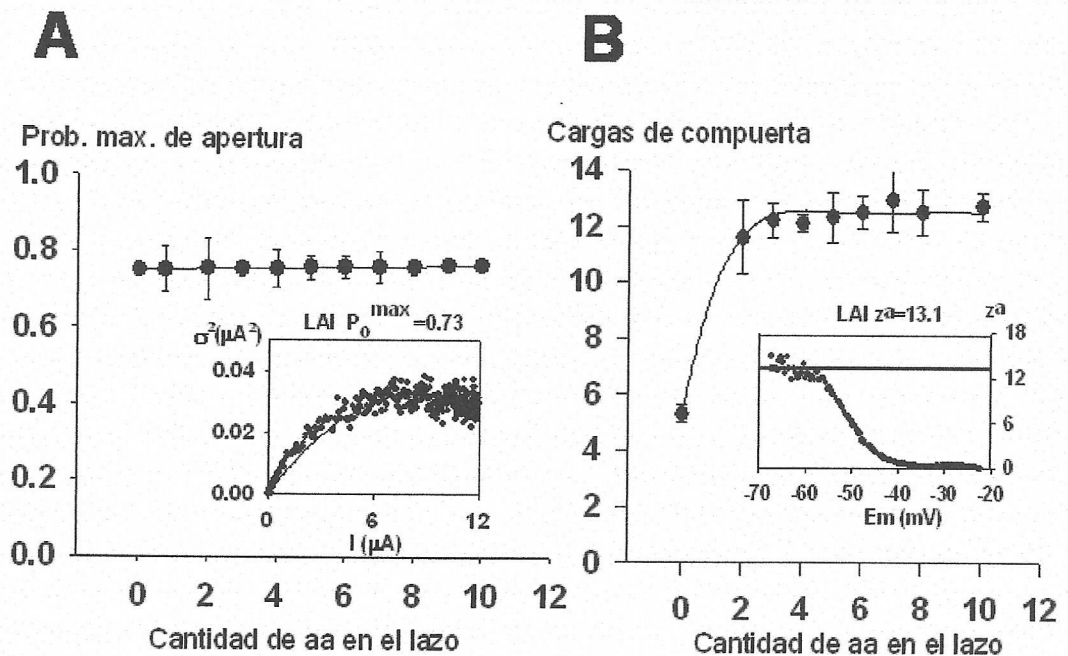


Figura 24. Cálculo de  $P_o$  max y del número de cargas equivalentes de compuertas para los mutantes de delección del lazo S3-S4. A. Análisis de varianza para los mutantes de delección. La línea representa el  $P_o$  max promedio para los distintos mutantes. Inseto: gráfico de varianza versus corriente promedio para el mutante LAI ajustado a una parábola  $\sigma^2 = iI - I^2/N$ . B. Análisis de pendiente límite para los canales mutantes en el lazo S3-S4. Inseto: gráfico de  $z$  v/s  $V$ . La línea indica el valor asintótico de  $z$  a potenciales muy hiperpolarizantes.

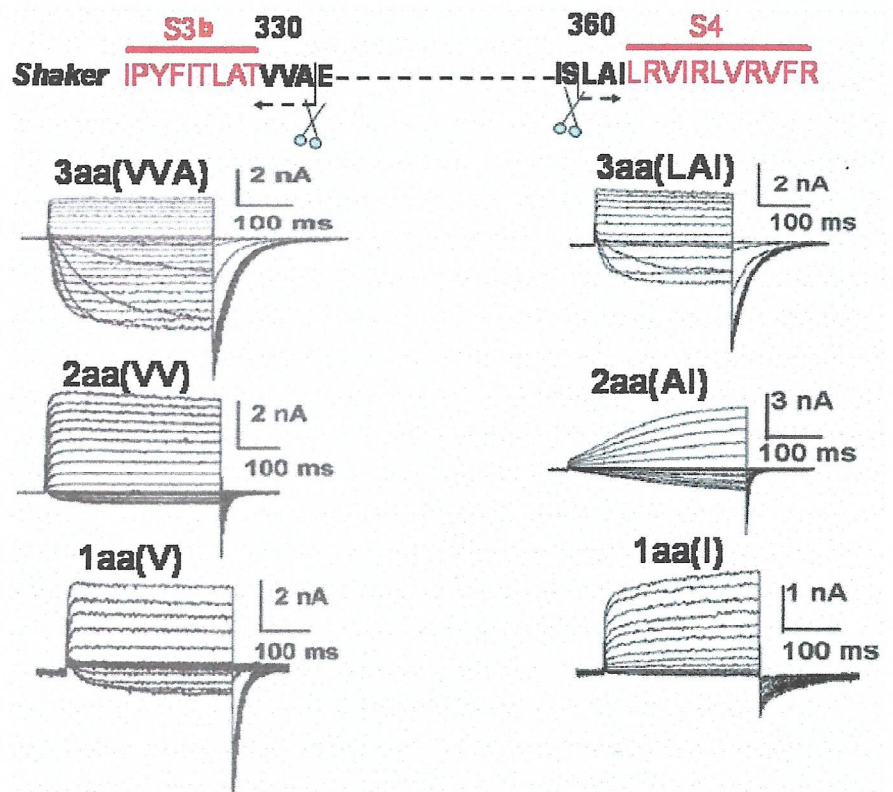
Para todos los mutantes de lazo S3-S4 de más de 1 residuo se determinó una  $P_o$  max promedio de 0,75, reflejo de que esta medida en el equilibrio no fue afectada a pesar de la significativa supresión de aminoácidos en



el lazo. (Figura 24A y tabla II). En el caso de la carga de compuerta tampoco se obtuvo cambios significativos excepto para el mutante sin lazo como se reportó anteriormente en el texto. (Figura 24B y tabla II).

## 2. Repercusión de la naturaleza aminoacídica del lazo S3-S4, en la activación del canal *Shaker*.

Figura 25. Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de deleción con aminoácidos de distinta naturaleza en el lazo S3-S4. El potencial de "holding" fue -100 mV, y la membrana fue estimulada por voltajes entre -100 y +125 mV con incrementos de 10 mV seguidos de un pulso a -60 mV.



Para resolver este objetivo se generaron mutantes de diferentes longitudes de lazo, pero siguiendo esta vez la secuencia aminoacídica del canal *shaker*,

correspondiente al N-terminal del lazo S3-S4. Los primeros mutantes generados fueron de 1, 2, 3 aa, con una secuencia de V, VV y VVA, respectivamente. Al comparar los patrones de corrientes macroscópicas generados en iguales condiciones que los registros para los mutantes con lazo S3-S4 de igual longitud pero con los residuos correspondientes al extremo C-terminal, encontramos diferencias significativas en cuanto a las propiedades estudiadas. (Figura 25). Los mutantes V(1aa) y VV(2aa) son dos órdenes de magnitud más rápidos en activarse que sus homólogos en cantidad de aminoácidos I(1aa) y AI(2aa). Por otra parte para el mutante de 3aa de secuencia VVA, la curva  $G-V$  está desplazada a valores más negativos (30 mv) con respecto a su homólogo LAI, tal y como se muestra en figura 25, para el mutante VVA es mucho mayor la corriente de entrada, a partir del mismo protocolo de voltaje y en la misma escala temporal. Nosotros no tenemos una explicación a esta paradoja, pero parece que no sólo el tipo de aminoácido sino que también el orden en que disponemos la secuencia aminoacídica, modifican tanto las constantes de activación como las medidas en el equilibrio, en otras palabras estos parámetros son modificados probablemente atendiendo a la interacción con los segmentos S3 ó S4 en contacto con la secuencia estudiada. La anterior afirmación está



sustentada por el hecho de que el mutante de 5aa de secuencia natural MSLAI es mucho más lento que el mutante VVLAI, el cual tiene una constante de activación 10 veces más rápida, sin embargo, para el mutante MSLVV se determinó una constante de activación mucho más lenta comparada con los mutantes anteriores y el control (ver Tabla resumen II).

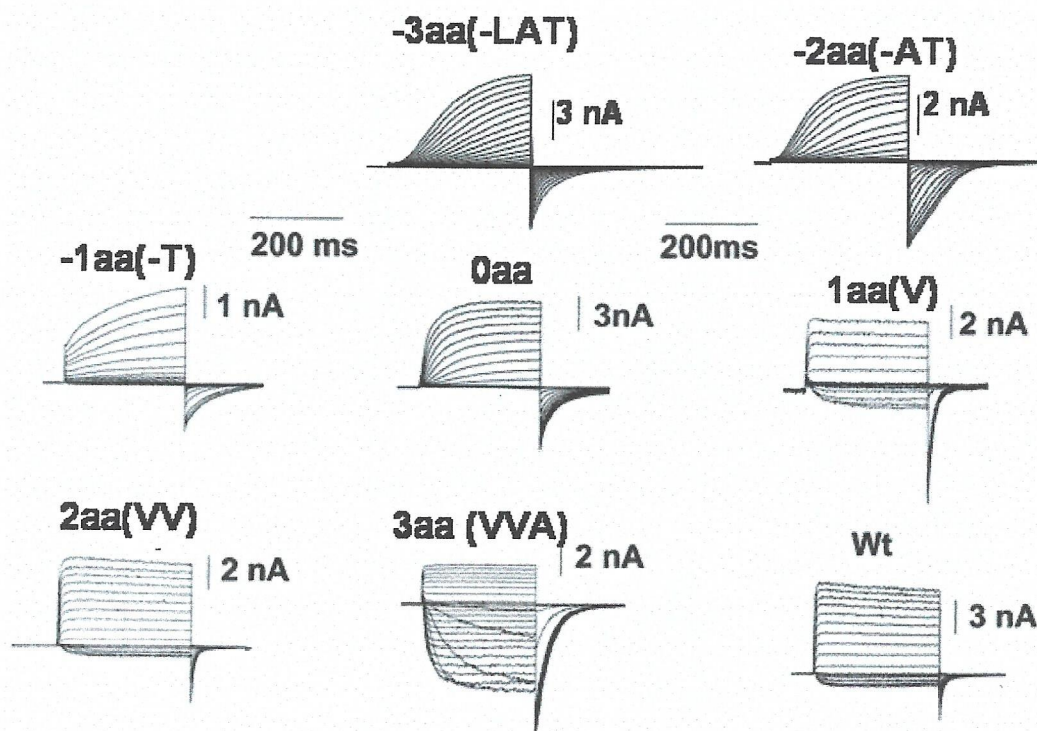
### **3. Repercusión de la delección de aminoácidos en el segmento S3 en la activación del canal *Shaker* sin lazo S3-S4.**

A fin de conocer la participación del segmento S3 en el mecanismo de activación del canal *Shaker*, nosotros construimos mutantes en que se dejó fuera parte del segmento S3. Se procedió a quitar residuos ordenadamente desde el C-terminal del S3 hacia el N-terminal, obteniéndose los mutantes sin lazo S3-S4 y sin 1aa (-T), sin lazo S3-S4 y sin 2aa (-AT) y así sucesivamente hasta eliminar todo el segmento S3, según la topología de Wallner y col., 1996. De todas las mutaciones construidas, sólo las que se muestran en la Tabla III expresaron corrientes reconocibles como transportadas por *Shaker*.

**Tabla III. Mutantes de supresión en la región S3 del canal *Shaker* hacia N-terminal de la proteína.**

| Mutantes de delec. |             |        |                    |          | $N_r$ |
|--------------------|-------------|--------|--------------------|----------|-------|
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (326-360) | -LAT     | -3    |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (327-360) | -AT      | -2    |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (329-360) | -T       | -1    |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (330-360) | sin lazo | 0     |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (331-360) | V        | 1     |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (332-360) | VV       | 2     |
| <i>Shaker</i>      | H4 $\Delta$ | (6-46) | $\Delta$ (333-360) | VVA      | 3     |

$N_r$  es el número de residuos presentes en el lazo S3-S4 según la topología de Wallner y col. (1992).



**Figura 26. Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes de deleción de casi todo el lazo S3-S4 y parte del C-terminal del S3. El potencial de mantenimiento fue -100 mV, y la membrana fue estimulada por voltajes entre -100 y +125 mV con incrementos de 10 mV seguidos de un pulso a -60 mV.**

En la tabla III sólo se muestran los mutantes que expresaron una clara funcionalidad a partir del registro de sus corrientes macroscópicas.

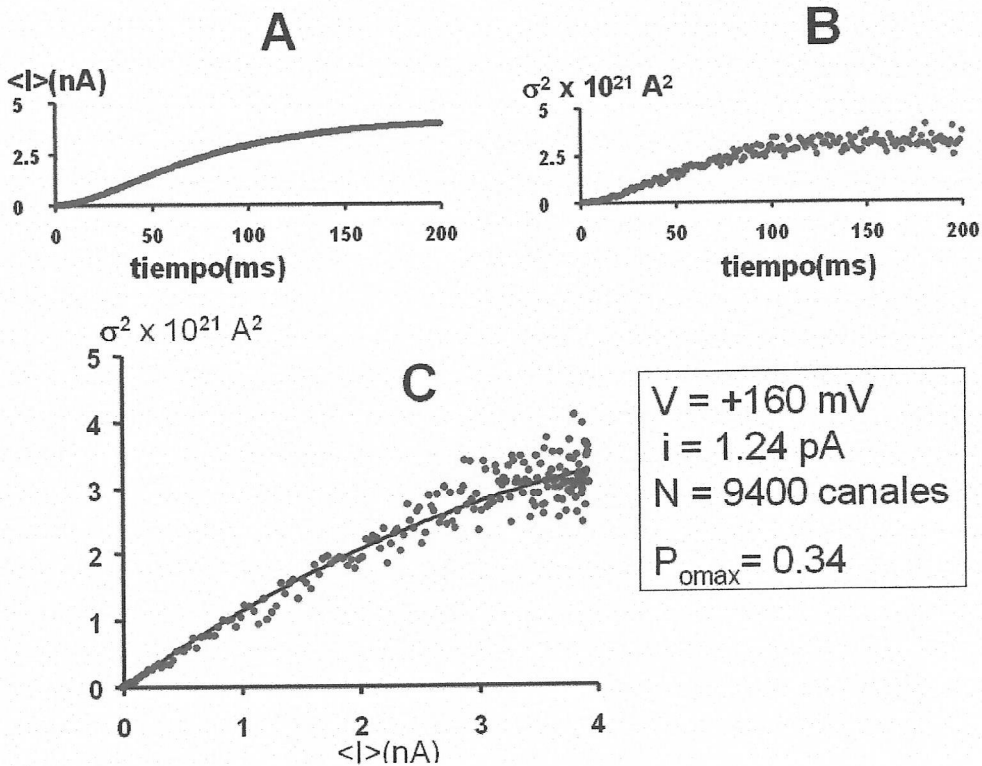
### 3.1. *Propiedades cinéticas y en el equilibrio del canal Shaker con diferentes longitudes del S3.*

Al igual que por el extremo del lazo en contacto con el S4, los mutantes de delección en contacto con el S3 mostraron robustas corrientes macroscópicas al aplicar los protocolos de despolarización equivalentes a los aplicados a los mutantes descritos anteriormente (Figura 26). Sin embargo, fue imposible detectar corrientes macroscópicas incluso después de 3 a 4 días después de la microinyección del RNA que codifica para el mutante -TLAT.

### 3.2. *Determinación de la Probabilidad máxima de apertura para los mutantes de delección por el lado del S3.*

La probabilidad máxima de encontrar el canal abierto  $P_{o,max}$  para el mutante (-LAT) con 3aa menos en el S3, fue de 0,34, claramente menor

que el control (0,75) (Figura 26). La conductancia unitaria ( $g_i$ ), obtenida al dividir 1,24 pA de corriente unitaria por 160 mV, fue de 8 pS (Figura 27).



**Figura 27. Análisis de varianza para el mutante -LAT. A.** Curso temporal de la corriente promedio para +160 mV. **B.** Curso temporal para la varianza al mismo potencial de (A). **C.** Gráfico de varianza a partir de 256 pulsos a voltaje de 160 mV v/s corriente promedio.

Este valor no es muy diferente al del control que es de aproximadamente de 10 pS. Las restantes mutaciones no exhibieron cambios, ni en sus  $P_{\text{omax}}$ , ni en sus  $g_i$  con respecto al canal control, registrando valores promedio de 0,7 y 10 pS, respectivamente.



### 3.2. Cuantificación de las constantes de tiempo para la activación.

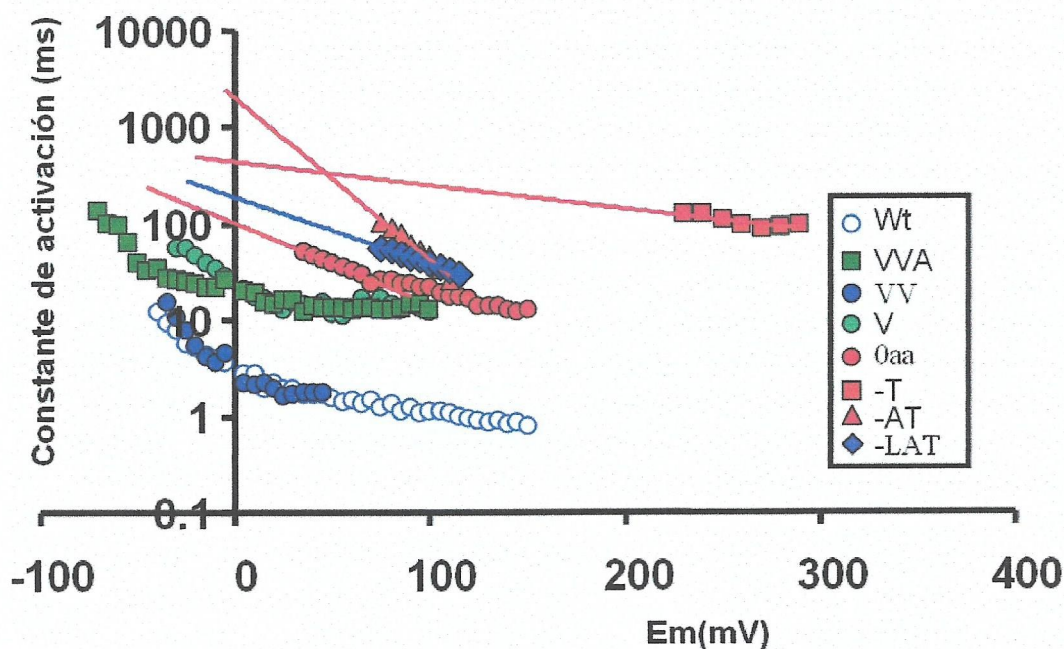


Figura 28. Dependencia de potencial de las cinéticas de activación de los mutantes de deleción por el lado del S3. El cálculo de las constantes se realizó exactamente igual que se describió para la mutación sin lazo al inicio de este capítulo.

Al igual que para los mutantes de supresión del C-terminal, no se pudo establecer una relación lineal entre el número de aminoácidos presentes en la porción de lazo ó en el S3 con respecto a la facilidad ó rapidez con que se abren los canales. (Figura 28). En esta figura se muestra la relación entre la  $\Delta\Delta G^*$  calculada a partir de las constantes de tiempo extrapoladas a potencial 0 mV, y el número de residuos en la región de interés, como se define en la Tabla III.

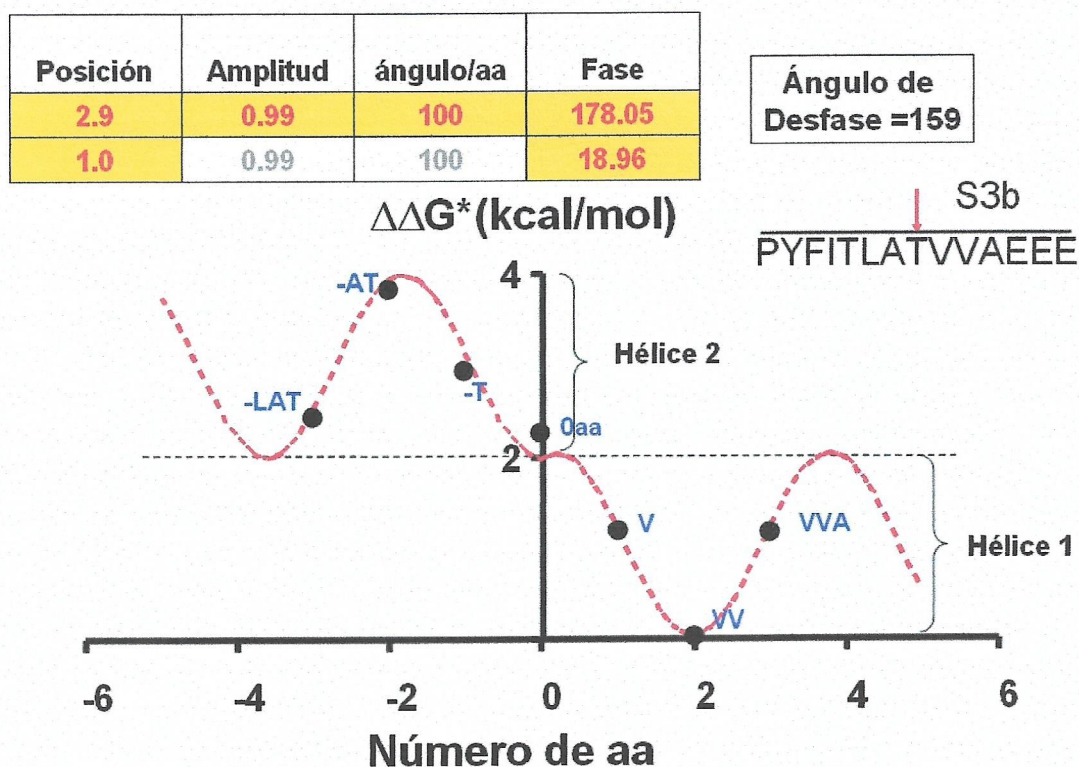


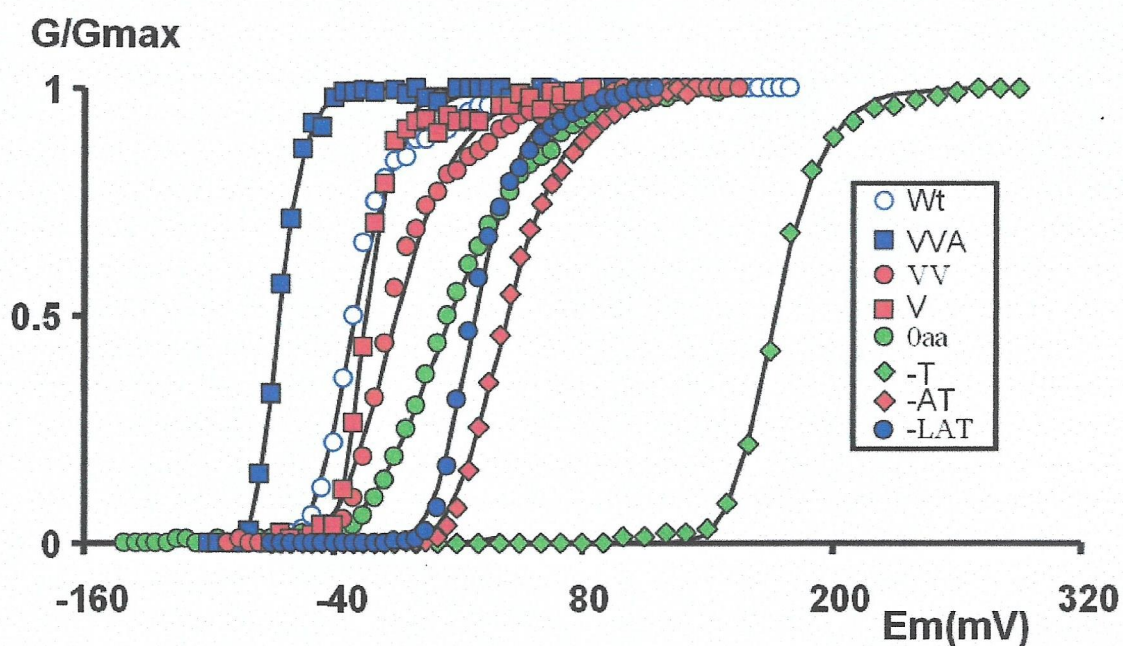
Figura 29. Diferencia de energía libre para la activación ( $\Delta\Delta G^*$ ) que caracteriza la etapa limitante de la velocidad de apertura en los mutantes de delección hacia el lado del S3b. La línea punteada en rojo indica el ajuste a una función seno. (Ver Ecuación 7.0 en Materiales y Métodos).

El comportamiento periódico encontrado se puede representar como dos funciones de la forma  $\Delta\Delta G = a + b \sin(\theta n + \varphi)$  donde  $a$  y  $b$  son constantes,  $n$  el número de residuos  $\theta$  la frecuencia angular y  $\varphi$  una fase. La frecuencia angular se forzó a ser 100 grados por residuo correspondiente a estructuras en forma de alfa hélices con 3,6 aminoácidos por vuelta y se usó diferentes fases para  $n = -3, -2, -1$  y  $0$  y

otra para el  $n = 0, 1, 2$  y  $3$ . La diferencia de fase es de 160 grados: El quiebre de fase se produce en el residuo Treonina 329. (Figura 29).

De estos resultados podríamos inferir que el S3b es una estructura en forma de alfa hélice quebrada en el residuo: Treonina 329. (Figura 29; ver discusión).

### 3.4. Cuantificación de las $V_{1/2}$ para los mutantes de delección en el S3.



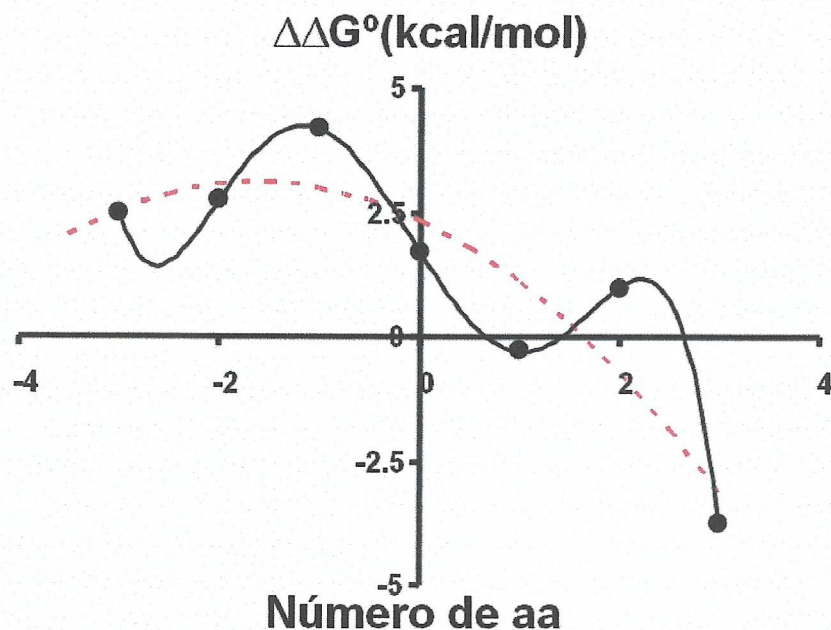
**Figura 30.** Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por las delecciones del S3. Cada punto es el promedio de 5 a 10 parches diferentes. Los puntos fueron ajustados a una ecuación de Boltzmann elevada a la cuarta potencia como se describe en Materiales y Métodos.

$V_{1/2}$  no son directamente proporcionales a la cantidad de aminoácidos presentes en la región estudiada, en otras palabras no se puede afirmar



que mientras menos aminoácidos estén presentes en esta región mayor será la cantidad de energía que haya que suministrarle al canal para lograr su apertura (Figura 30). Llama mucho la atención que el mutante sin lazo S3-S4 y sin el aminoácido Treonina 329 que llamamos -T, tiene un desplazamiento de casi 200 mV con respecto al control. Por lo tanto la energía necesaria para activar los sensores de voltaje ( $\Delta\Delta G^\circ$ , ecuación 5 de Materiales y Métodos) de la proteína mutante es 5 kcal/mol mayor que la del control. Sin embargo, a diferencia de la periodicidad obtenida a partir de las constantes de tiempo, no se logró ajustar una función periódica que diera cuenta de un claro y periódico comportamiento para las diferencias de energía calculadas a partir de las  $V_{1/2}$ . (Figura 31).

Una posible explicación a esta diferencia podría ser que a las constantes de tiempo sólo están vinculadas las etapas limitantes a diferencia de los  $V_{1/2}$  que están modificados por todas las transiciones que conducen a la apertura del canal.

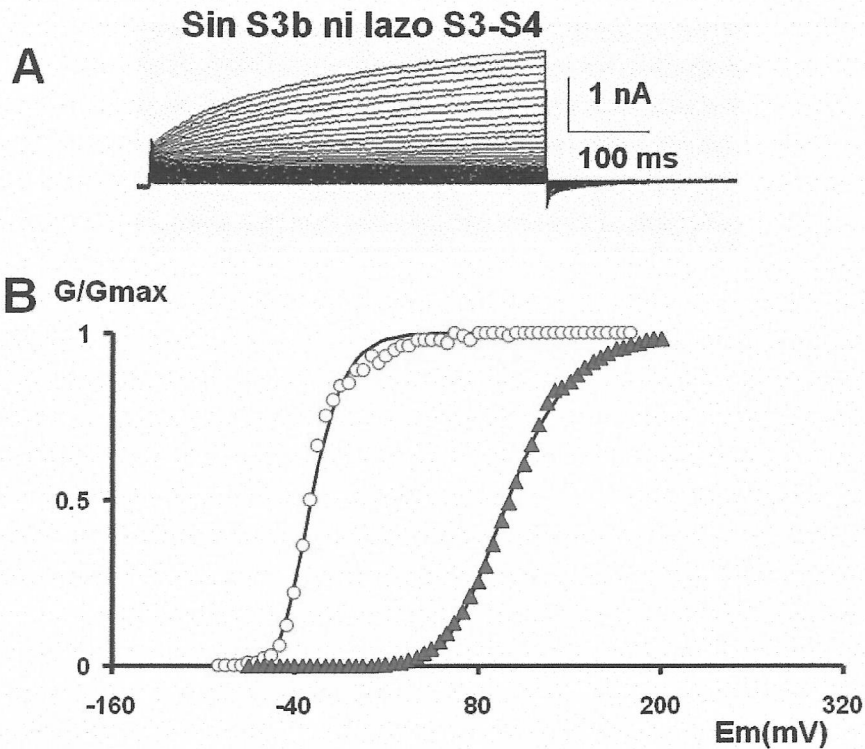


**Figura 31.** Distribución de las perturbaciones en energía libre ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) durante la apertura del canal inducidas por las deleciones del S3. Con línea discontinuas rojas se destaca el intento de ajuste a una función seno (Ecuación 7.0 de Materiales y Métodos. La línea negra representa el ajuste a un polinomio.

### 3.5. Recuperación de la actividad funcional del canal. (Delección desde la Metionina 312 hasta la Isoleucina 360)

Un resultado sorprendente fue el recobrar la funcionalidad del canal en el mutante que no tiene ni el lazo S3-S4, ni el segmento S3b (Figura 32A). Para corroborar que el patrón de corriente macroscópicas obtenido (Figura 32A), corresponde a la actividad de proteínas exógenas del oocito, se realizaron diferentes medidas a diferentes tiempos después de la inyección del mRNA, en el mismo “pool” de oocitos. A las 24 y 48

horas, después de la inyección la cantidad de canales es muy escasa si lo comparamos con la expresión de otras mutaciones estudiadas que fueron transcritas con la misma concentración de sus mRNA. Sin embargo, pasadas las 72 horas, se hace más notoria la concentración de canales truncados en la membrana, al detectar mayor densidad de corriente macroscópica. Por otra parte, al determinar su curva  $G-V$ , encontramos un desplazamiento significativo a potenciales más positivos de aproximadamente 100 mV (Figura 32B). De forma tal que se hace necesario imprimir más energía al canal para su activación. Una posible interpretación de este resultado es que el segmento S3a ocupe el papel del lazo S3-S4. Sin embargo, para especular acerca de los posibles mecanismos que expliquen este fenómeno se hace imprescindible, caracterizar aún más esta mutación en relación a su selectividad iónica y sensibilidad a toxinas específicas para canales *Shaker*. Aspectos que no será abordado como uno de los objetivos de esta tesis.



**Figura 32. Patrón de corrientes macroscópica para el mutante sin lazo S3-S4 ni segmento S3b.** A. Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes en que se eliminó por completo el segmento S3 y el lazo S3-S4. El potencial de “holding” fue -100 mV, y la membrana fue estimulada por voltajes entre -100 y +125 mV con incrementos de 10 mV seguidos de un pulso a menos 60 mV.

B. Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por la delección del S3. Cada punto es el promedio de 5 a 10 parches diferentes. Los puntos fueron ajustados a una ecuación de Boltzmann elevada a la cuarta potencia como se describe en Materiales y Métodos. En círculos aparece la curva control y en triángulos aparece el mutante sin segmento S3b ni lazo S3-S4.

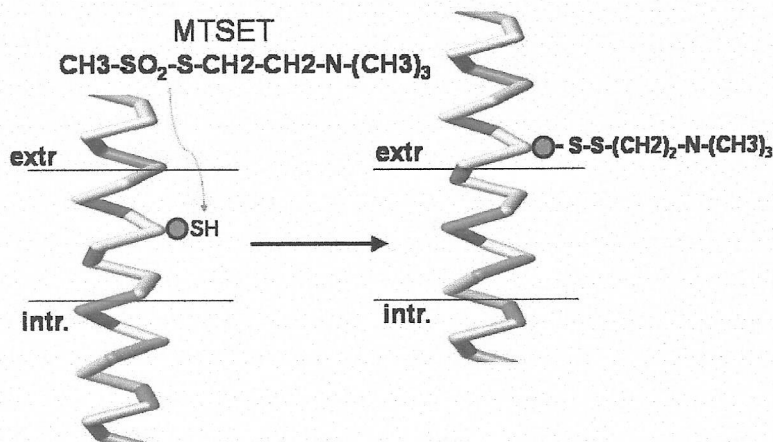
#### 4. Evaluación del modelo de remo para el canal de potasio *Shaker*.

Como ya se mencionó, durante el desarrollo de esta tesis salió a la luz la primera estructura cristalina de un canal de más de dos segmentos de

transmembrana, el canal bacteriano KvAP. Sobre la base de esta estructura y de la estructura del cristal compuesto por los segmentos S1 a S4, el grupo de MacKinnon (Jiang y col. 2003) propuso un modelo en el cual parte del S3 (S3b), el lazo S3-S4 conjuntamente con el S4 dan origen al sensor de voltaje. Esta estructura se denominó paleta o remo. Esta paleta se mueve desde el medio interno hasta el medio extracelular impulsada por el campo eléctrico, y el cambio conformacional desencadena la apertura del canal.

Con el modelo de remo para el sensor de potencial del canal KvAP nos hicimos la siguiente pregunta: ¿Existe una estructura en forma de paleta formada por el S3b y el lazo S3-S4 en el canal de  $K^+$  *Shaker*?

Para responder a esta interrogante, construimos mutantes con residuos de cisteínas en diferentes posiciones del S3b, del lazo S3-S4 y del S4 para estudiar su reactividad con el MTSET (Figura 33).



**Figura 33.** Esquema que representa la reacción del MTSET con el grupo sulfhidrilo de los residuos de cisteínas. La reacción entre la cisteína y el MTSET se sigue a través de algún cambio en la actividad del canal. Por ejemplo, cambios en la magnitud de las corrientes o cambios en la cinética de apertura.



En principio, estos experimentos deberían ayudarnos a responder que regiones del remo se exponen al medio extracelular cuando el canal se abre. El modelo de paleta ó remo predice que cuando el canal está cerrado los residuos presentes en el segmento S3 no están expuestos al medio extracelular, esto ocurre sólo cuando el canal se abre.

#### 4.1. Mutantes de cisteína en diferentes posiciones del S3b con un lazo S3-S4 igual al canal control.

Los residuos de cisteínas fueron ubicados en las posiciones, 328, 326, 324, 321, 315 de la proteína, generando los siguientes mutantes que llamamos: A328C-lazoControl, T326C-lazoControl, F324C-lazoControl, I321C-lazoControl e I315C-lazoControl, estas posiciones recorren todo el S3b, según el alineamiento propuesto para *Shaker* con respecto a KvAP (Figura 34).

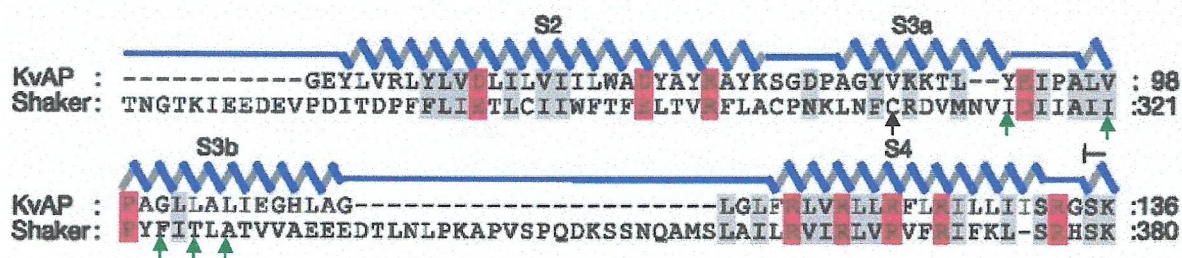


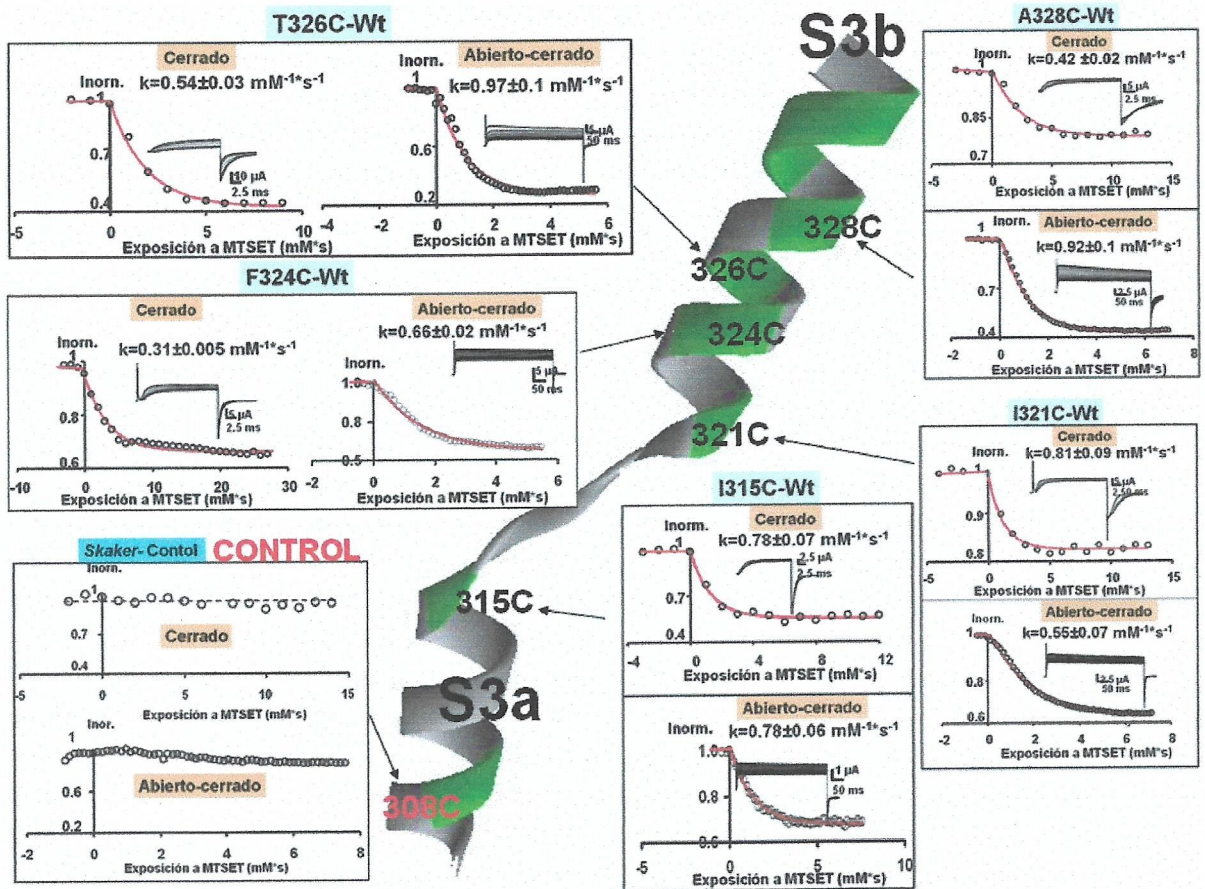
Figura 34. Alineamiento de las secuencias de los segmentos S2, S3 y S4 de los canales KvAP y *Shaker*. Las flechas verdes indican los residuos de aminoácidos que fueron reemplazados por cisteínas. Se destaca en rojo los residuos esenciales de los canales de potasio. La flecha negra señala la cisteína que posee el canal *Shaker* control.

Al aplicar los protocolos de cerrado y abierto-cerrado descritos en la sección de Materiales y Métodos se detectó reactividad al MTSET añadido al medio externo a una concentración final de 100  $\mu$ M para todos los mutantes (Figura 35). De esta forma los residuos siempre fueron expuestos a la acción del reactivo. Como se aprecia en la Figura 35, no parece existir una preferencia por el estado cerrado o abierto del canal, pues las constantes de reacción calculadas para todas las mutantes fueron prácticamente las mismas. En la figura 35 también podemos observar que la cisteína en posición 308, presente en el canal control, no reacciona con el MTSET.

Estos resultados nos sugieren que el S3b, en un canal con un lazo S3-S4 de 31 aa, siempre está expuesto al medio extracelular.

La segunda interrogante que formulamos fue: ¿Podríamos formar una estructura en forma de paleta para el canal *Shaker*, formada por estas 3 regiones, acortando el lazo S3-S4 como aparece en el canal KvAP en su forma nativa? (ver alineamiento en Figura34).





**Figura 35.** Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3 en canales con lazo similar al control. Los protocolos de estimulación se explican en Materiales y Métodos. Las cisteínas estudiadas fueron introducidas a lo largo de todo el S3b una a una. La cisteína en la posición 308 existe naturalmente en el canal *Shaker*, y no es accesible a MTSET (Control).

#### 4.2. Mutantes de cisteína en el S3 (F324C) con diferentes longitudes de lazo S3-S4.

Para responder a la interrogante anteriormente formulada, nosotros colocamos una cisteína en el centro de la secuencia del S3b, en la posición F324, y generamos 3 mutantes de diferente largos de lazo: de 10 aa

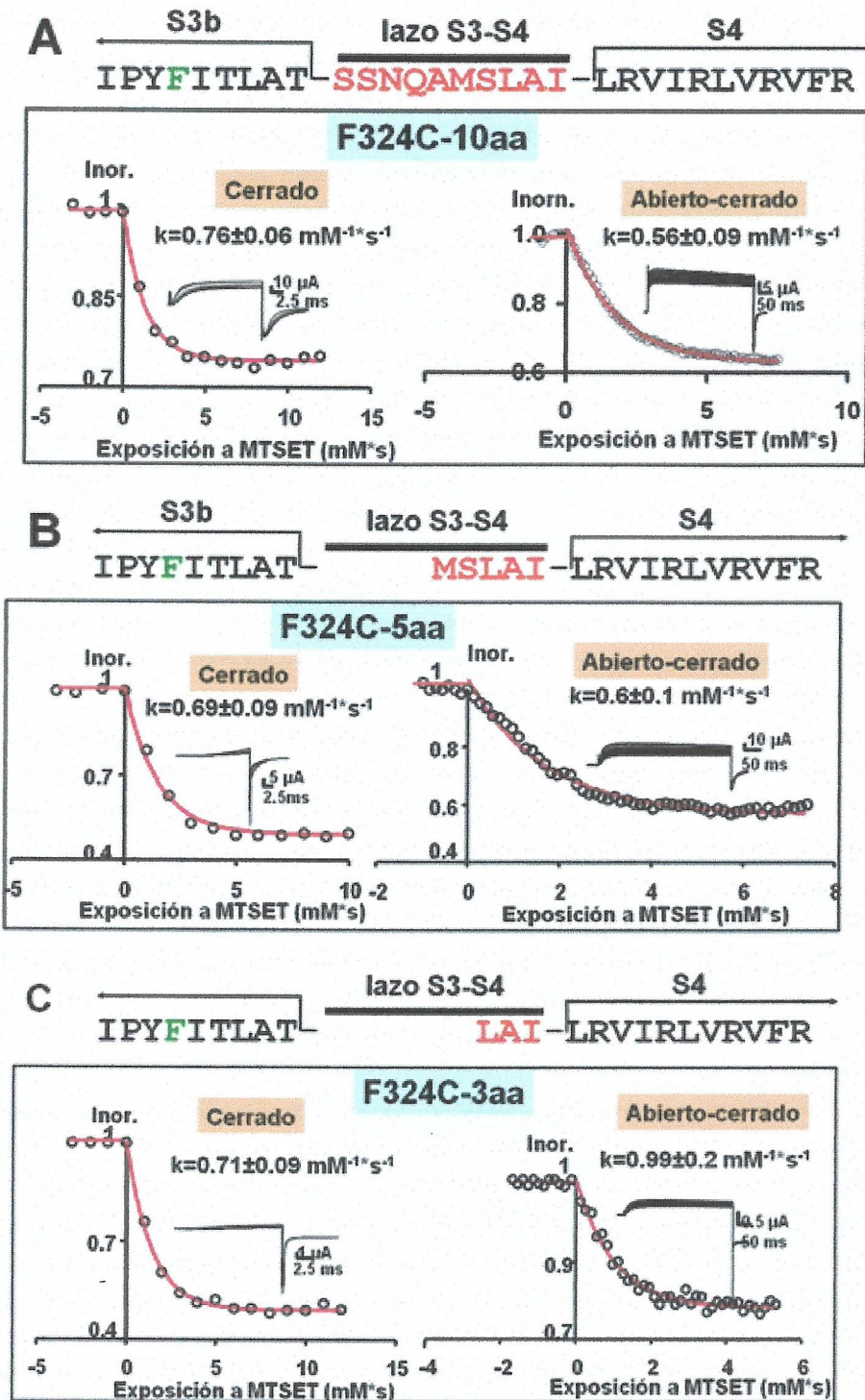


Figura 36. Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3a (posición F324) en canales con diferentes longitudes de lazo S3-S4. A. Mutante F324 C con 10 aa en el lazo y una secuencia: SSNQAMSLAI. B. Mutante F324 con 5aa en el lazo y secuencia: MSLAI. C. Mutante F324 con 3aa en el lazo y secuencia: LAI. De izquierda a derecha reacción con MTSET para los estados cerrado y abierto-cerrado del canal.



(SSNQAMSLAI), 5aa (MSLAI) y 3 aminoácidos (LAI), respetando la secuencia aminoacídica en contacto con el S4 del canal *Shaker*. En la Figura 36 se muestra que la cisteína 324 reacciona siempre con el MTSET y de manera independiente del largo del lazo. Como se puede apreciar de la figura la reactividad de este residuo al MTSET no depende mucho si el canal está abierto o cerrado. Si comparamos los valores de constantes de reacción a la exposición de MTSET no se modifican unos con respecto a otros, lo que sugiere que la longitud del lazo no es determinante para exponer esta posición a su reacción con MTSET. (Figura 36).

En este caso la única posición explorada fue la F324, que si bien está en el centro no responde la interrogante acerca de:

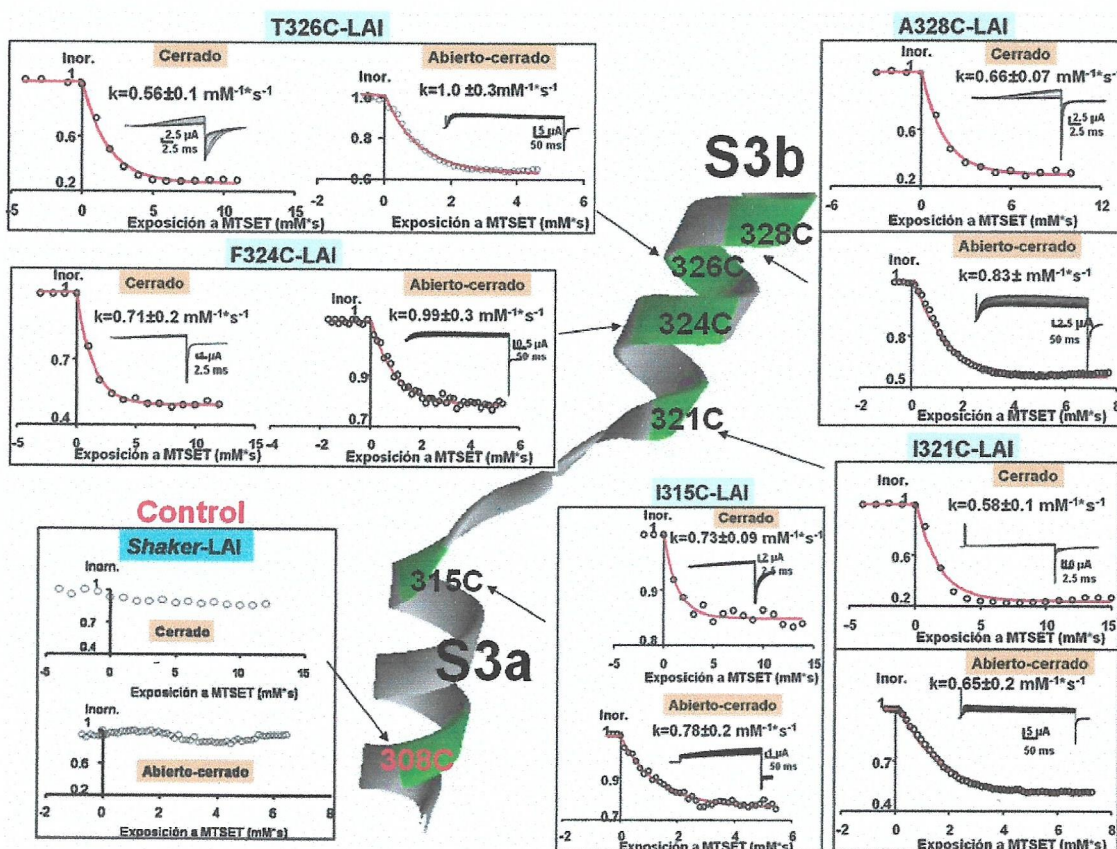
¿Cuán expuestos están los demás residuos a MTSET cuando el lazo S3-S4 es muy corto?

#### 4.3. Mutantes de cisteína en diferentes posiciones del S3b con un lazo S3-S4 corto de 3aa.

Para ello tomamos como base el lazo más corto de 3aa con secuencia LAI y exploramos las mismas posiciones que con el lazo del *Shaker* control: 328,

326, 324, 321 y 318. De esta manera generamos los siguientes mutantes: A328C-3aa, T326C-3aa, F324C-3aa, I321C-3aa y I315C-3aa.

Todos los mutantes estudiados mostraron reactividad al MTSET, al exhibir claros cambios de sus patrones de corriente al aplicar ambos protocolos de voltaje y añadir el reactivo por el lado externo. Al igual que para las otras mutaciones no se detectaron grandes diferencias en relación a sus constantes con respecto al estado del canal o a la posición del residuo estudiado. (Figura 37).



**Figura 37.** Accesibilidad a MTSET de las cisteínas introducidas en el segmento S3 en canales con un lazo de 3aa con secuencia: LAI. Los protocolos de estimulación se explican en Materiales y Métodos. Las cisteínas estudiadas fueron introducidas a lo largo de todo el S3b una a una. La cisteína en la posición 308 existe naturalmente en el canal *Shaker*, y no es accesible a MTSET (Control).

Si comparamos todas las constantes de reacción a MTSET para todos los mutantes estudiados podemos concluir que no dependen ni de la posición del residuo de cisteína, ni del largo del lazo para acceder a estos residuos con el MTSET externo, y depende muy poco del estado del canal, pues sus valores están comprendidos en el intervalo de  $0,3-1 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ . El hecho de no hallar diferencias en órdenes en cuanto a las constantes de reacción nos hace pensar que todos los residuos están expuestos a una misma reacción química sin restricción. (Figura 37).

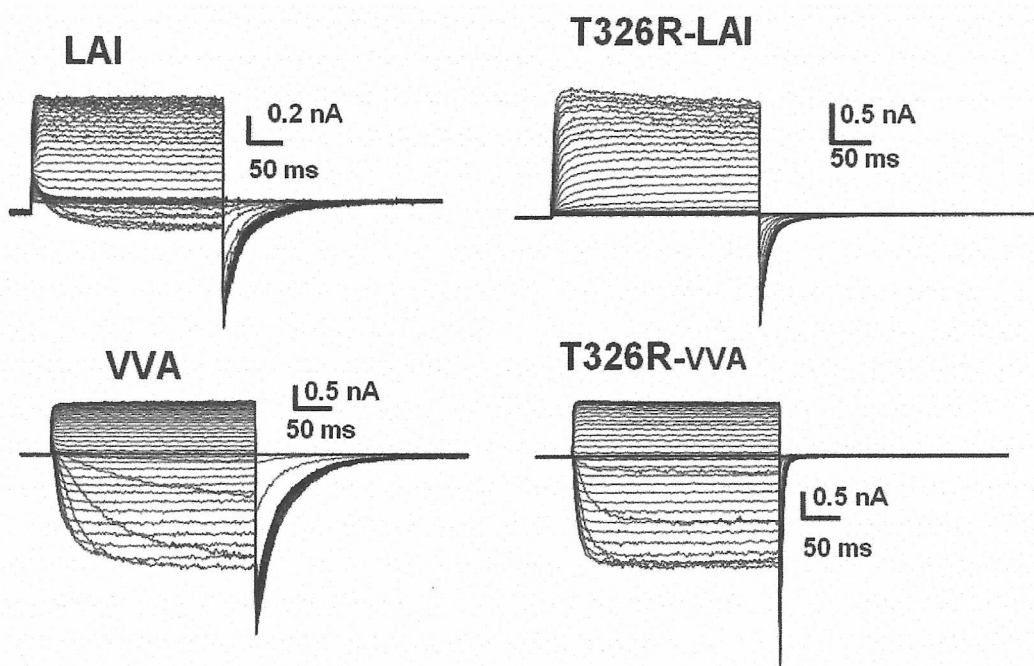
Estos resultados nos llevan a proponer la siguiente hipótesis: el segmento S3b está expuesto al solvente todo el tiempo y posiblemente hacia la parte extracelular formando un gran lazo desde la posición isoleucina 315 ubicada al comienzo del S3b hasta el final del lazo S3-S4.

Otra posibilidad, es que una parte del S3b específicamente hasta la Prolina (como explicaremos más adelante en la sección de discusión) esté hacia la parte extracelular y el resto hasta la Isoleucina 315 esté mirando hacia una cavidad o grieta donde puede acceder el MTSET añadido desde el lado externo.

Sin embargo, estos experimentos indican solamente reactividad o no, al MTSET, pero no brindan información alguna acerca del movimiento del

sensor de voltaje a través del campo eléctrico aplicado. Es por ello que para responder a la interrogante de: ¿Será arrastrado el S3b a través del campo eléctrico por el S4, cuando el canal *Shaker* tiene un lazo muy corto (de 3aa), parecido al canal KvAP?

4.4. Determinación de las carga de compuerta para mutantes de lazo corto (3aa) con el segmento S3b cargado.



**Figura 38.** Corrientes macroscópicas obtenidas por la expresión funcional de los mutantes con carga en el segmento S3. El potencial de “holding” fue -100 mV, y la membrana fue estimulada por voltajes entre -100 y +125 mV con incrementos de 10 mV seguidos de un pulso a -60 mV.



Para responder a esta interrogante generamos dos mutantes con una arginina en la posición T326 y con un lazo de 3 aminoácidos, de secuencia LAI y VVA.

Los mutantes fueron llamados atendiendo a la sustitución realizada y a la secuencia en el lazo en: T326R-LAI y T326R-VVA.

Como se muestra en la figura 38, la introducción de una arginina en la posición T326 no varía mucho el patrón de corriente macroscópica con respecto al mutante sin la sustitución pero de igual secuencia en el lazo S3-S4.

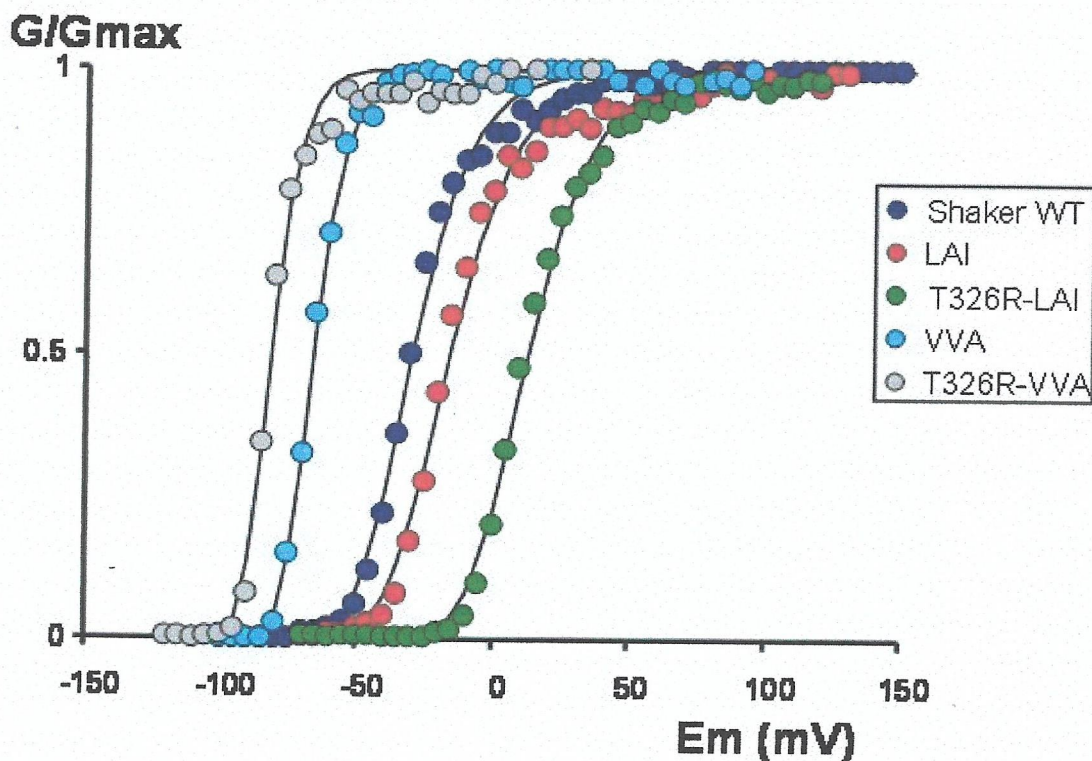
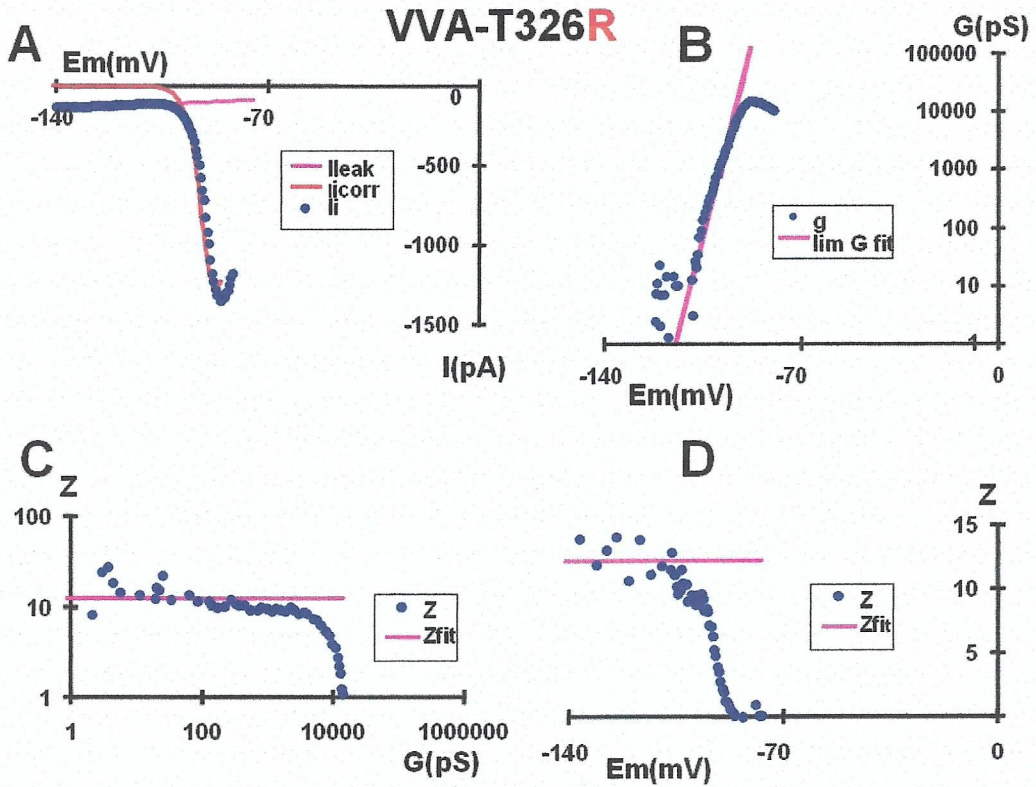


Figura 39. Efecto sobre la dependencia de potencial inducidas por adición de cargas en el segmento S3. Cada punto es el promedio de 5 a 10 parches diferentes. Los puntos fueron ajustados a una ecuación de Boltzmann elevada a la cuarta potencia como se describe en Materiales y Métodos.

Sin embargo, al determinar la relación  $G-V$  encontramos un desplazamiento a valores más positivos con respecto al control para la mutación T326R-LAI, de tal forma que por debajo de 0mV la probabilidad de que los canales se abran es prácticamente cero. A diferencia de este mutante, la curva  $G-V$  para el mutante T326R-VVA mostró un desplazamiento a valores más negativos que el control (Figura 39), por lo que decidimos utilizarlo como el candidato a determinar el posible aumento de la carga de compuerta en condiciones de potasio simétrico (110 mM). Como se muestra en la Figura 40, el número de cargas de compuerta determinado fue de 12. Este valor es similar al reportado para el canal *Shaker* control. (Figura 19).

De estos resultados podemos concluir que la arginina introducida en la posición 316 no contribuye al número de cargas de compuerta y, por lo tanto, no se desplaza en el campo eléctrico. Nuestros resultados nos inducen a pensar que el modelo de paleta ó remo para el sensor de voltaje no se puede aplicar al canal *Shaker*.



**Figura 40. Análisis de pendiente límite para el canal *Shaker* VVA-T326R.** En A se muestra el gráfico de corriente ( $I$ ) versus potencial ( $V$ ). En B se muestra el gráficos semilogarítmicos para la relación  $G$  v/s  $V$ . La línea indica el ajuste de los datos para determinar el valor límite de  $z$ . En C y D se muestra los gráficos  $z$  v/s  $G$  y  $z$  v/s  $V$ , respectivamente. La línea indica el valor asintótico de  $z$  a potenciales muy hiperpolarizantes obtenidos de la derivada con respecto al voltaje del ajuste monoexponencial de los datos a probabilidades muy bajas.

## DISCUSIÓN

### ***1. Papel del lazo S3-S4 en el canal de K<sup>+</sup> Shaker.***

Aún cuando está bien establecido que, en muchos canales dependientes de voltaje, el segmento transmembranal S4 es parte de sensor de potencial, (Liman y col., 1991; Papazian y col., 1991; Bezanilla y col., 1991; Perozo y col., 1994; Aggarwal y MacKinnon, 1996; Larsson y col., 1996; Mannuzzu y col., 1996; Seoh y col., 1996; Yang y col., 1996; Yussaf y col., 1996; Smith-Maxwell y col. 1998a y b; Díaz y col., 1998, Ledwell y Aldrich, 1999; Latorre y col., 2003), quedan muchas interrogantes sin resolver entorno de esta afirmación. Por ejemplo: ¿existen otros dominios estructurales ó regiones, además del segmento S4, que forman parte de la estructura para detectar el potencial? Si así fuera, ¿en qué forma están dispuestos estos dominios ó regiones dentro del sensor?, ¿cómo es su movimiento durante la activación de la proteína-canal?. Estas y muchas otras interrogantes podrían ser formuladas al respecto. Es por ello que esta tesis lleva precisamente ese espíritu, el de tratar de preguntar y dilucidar, o al menos intentar esclarecer en algo, qué papel juegan las regiones

estructurales cercanas al segmento S4, en la activación del canal de K<sup>+</sup> tipo *Shaker*.

1.1. *Mutante sin Lazo S3-S4: Constantes Cinéticas, Cargas Efectivas de compuertas y Máxima probabilidad de Apertura.*

Una de las conclusiones más claras de este trabajo es que la reducción del lazo S3-S4 no evita la máxima apertura del canal. El hecho de que el lazo pueda ser acortado drásticamente y el canal aún se abra con la misma probabilidad de apertura que el reportado para el *Shaker* control (Zagotta y col., 1994a; Seoh y col., 1996; Noceti y col., 1996), indicaría que el cambio conformacional del segmento S4 durante la activación está acoplado a la apertura del canal como en el canal silvestre.

Para el caso del mutante sin aminoácidos en el lazo S3-S4, la cinética de apertura está enlentecida 40 veces con respecto al control, lo que se refleja en una diferencia de energía libre de activación,  $\Delta\Delta G^* = 2$  kcal/mol. Esto significa que las barrera(s) de energía que determinan la ó las etapas limitantes (Zagotta y col., 1994a y b), se han hecho más altas en esa cantidad de energía libre cuando se las compara con las del canal silvestre. Otro resultado similar fue detectado para la diferencia de energía libre



necesaria para mover los sensores del estado de reposo al activo,  $\Delta\Delta G^{\circ}=1.9$  kcal/mol, calculadas a partir de la  $V_{1/2}$  del mutante y el *Shaker* control. Si bien hay diferencias, éstas son relativamente pequeñas pues, son comparables con la energía necesaria para romper un sólo enlace de hidrógeno (1-2 kcal/mol; Alberts y col., 1989).

Por otra parte, el hecho de una disminución de la pendiente de la curva G-V al ser ajustada a una distribución de Boltzmann a la cuarta potencia —que es un reflejo de la cantidad de carga asociada a los sensores— es corroborada a partir del cálculo de las cargas de compuerta por el método de la pendiente límite. En este caso la disminución a  $6 e_0$  del número de cargas de compuertas asociadas a la apertura, puede ser debido a diferentes razones. Una de ellas surge de que el número de carga está dado por el producto inseparable de dos parámetros: ( $z$ ), la carga que se desplaza en el campo y delta ( $\delta$ ), que es la distancia que se mueven estas cargas dentro del campo. En este caso, es posible que el número total de cargas reales que se mueven ( $z$ ) no esté afectado; pero si  $\delta$  como una resultante de los cambios estructurales que sufre el canal como consecuencia de la supresión del lazo. En otras palabras, si el potencial cae en una distancia eléctrica  $\delta$  mayor en el mutante y las cargas siguen moviéndose la misma distancia el resultado



será una disminución en el número aparente de cargas de compuerta. Por ejemplo si 12 cargas se mueven en la mitad del campo, el  $z\delta$  obtenido a través de la pendiente límite será 6. De hecho, si se tiene en cuenta que, para *Shaker*, en las cargas de “gating” participan los aminoácidos: R362, R365, R368, R371 (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y cols., 1996) y si multiplicamos estas 4 cargas por las 4 subunidades que forman el canal; el número total de cargas debería ser 16. Sin embargo, el número total de cargas, en el canal de  $K^+$  *Shaker*, es 13 cargas efectivas de compuerta (Noceti y col., 1996). Esto sugiere que no todas las cargas sienten el mismo valor de potencial, en otras palabras, el campo no cae equipotencialmente sobre todas las cargas de compuerta (Bezanilla, 2002). Una explicación alternativa para esta reducción en el número de cargas de compuerta podría ser que, al eliminar el lazo S3-S4, estemos creando nuevos estados abiertos. De forma tal que, por ejemplo, en un modelo cinético lineal, el número de cargas se repartan entre la cantidad de cargas que se mueven entre los diferentes cerrados hasta el primer abierto y otra parte del total de cargas que se mueven entre los estados abiertos generados por la delección. En este caso el método de la pendiente límite no es válido (Noceti y col., 1996; Sigg y Bezanilla, 1997).

Tal como se sugirió en los resultados, para estudiar la posible aparición de otro estado abierto al generar la mutación sin lazo S3-S4, se realizó una pequeña caracterización cinética de sus canales únicos. En este estudio no se logró distinguir cinéticamente otro estado abierto. Este resultado corroboró nuestra idea de que la disminución de carga no se debía a la generación de otro abierto.

*1.2. Periodicidad en el extremo C-terminal del lazo S3-S4 a partir de las Constante de Tiempo de Activación ( $\tau_{act}$ ) y las  $V_{1/2}$  asociadas a los Sensores.*

Un importante resultado lo constituye el hecho que, en la región C-terminal del lazo, la proteína-canal acomoda las deleciones con una periodicidad que evoca a una estructura de  $\alpha$ -hélice. Al tratar de establecer una correspondencia, entre el número de aminoácidos que fueron restaurados a partir del mutante sin lazo y la diferencia de energía libre para la activación ( $\Delta\Delta G^*$ ) ó la diferencia de energía libre para pasar de un estado en reposo a uno activo del sensor ( $\Delta\Delta G^0$ ), nos encontramos con una periodicidad en los datos. Al ajustarlos con la ecuación 7.0 (Materiales y Métodos) nos encontramos con una periodicidad angular de 3,6 aminoácidos por vuelta. Este resultado nos sugirió que estábamos en presencia de una región cuya

estructura correspondía a la de una  $\alpha$ -hélice. Un análisis de Fourier (Cornette y col., 1987), nos permitió una evaluación final de la periodicidad de  $\Delta\Delta G^*$  y  $\Delta\Delta G$  con respecto a la restauración de hasta 6 aa en el lazo S3-S4. Este análisis corroboró la presencia de una estructura helicoidal desde la Metionina 355 hasta la Isoleucina 360.

A pesar de esta corroboración experimental de la estructura de  $\alpha$ -hélice en esta región, se puede argumentar que el número de puntos incluidos en el análisis es demasiado pequeño (apenas 6) para describir una estructura helicoidal para el segmento analizado. Es por ello, que analizamos la probabilidad de encontrar tales valores de  $\alpha$ PI por azar, encontrándose valores de 0,06 para  $\Delta\Delta G^*$  y 0,03 para  $\Delta\Delta G^0$ , tras realizar 1000 permutaciones al azar de los datos.

Este análisis permite afirmar, con un margen de error de 3 a 6%, de que la relación de periodicidad establecida entre  $\Delta\Delta G^*$  y  $\Delta\Delta G^0$  con respecto al número de aminoácidos presentes en el lazo, es verdadera. En otras palabras, existe el mismo margen de error (entre 3 a 6%) al asegurar que la región presenta una estructura en forma de  $\alpha$ -hélice.

A partir de todo este análisis podemos concluir que, en la región comprendida desde la Met 355 hasta la Iso 360, hay una estructura en forma

de  $\alpha$ -hélice no predicha anteriormente. Esta estructura podría ser una continuación natural del segmento S4 ó simplemente una región helicoidal presente en el lazo S3-S4 (Gandhi y col, 2003).

Los resultados obtenidos con los mutantes del lazo S3-S4 también revelan que un lazo con sólo 3 aminoácidos (LAI) es suficiente para obtener una cinética de activación y un desplazamiento del sensor de voltaje equivalentes a las que se obtienen con el canal *Shaker* control. Por otra parte, la cinética de activación es igual a la del control, cuando el lazo contiene dos valinas (ver tabla II). Ésto nos indica que un canal con un lazo tan corto se abre normalmente, lo que implicaría que el movimiento del S4 es pequeño, mucho menor de 15 Å propuestos en algunos modelos (Durell y Guy, 1992). Siendo sumamente improbables aquellos modelos que proponen un gran desplazamiento vertical de las cuatro cargas de compuertas (Guy y Seetharamulu, 1986; Catteral, 1986; Gandhi y col., 2000). Sin embargo, no hemos descartado la posibilidad de que el S3 se mueva conjuntamente con el S4, en otras palabras, que el S4 arrastre al S3 en su movimiento vertical que es de aproximadamente 20 Å en el modelo de remo (Jiang y col., 2003b). Es obvio que si el S3 se desplaza en conjunto con el S4 la longitud del lazo no sería una limitante para el movimiento del sensor. Sin embargo,

como se discute más adelante, a partir de los resultados de accesibilidad, y en particular, por los resultados obtenidos sustituyendo residuos neutros del S3 por residuos cargados, es poco probable que el S3 se mueva de manera apreciable durante la activación.

*1.3. No periodicidad en el C-terminal del lazo S3-S4 a partir de las constante de tiempo de desactivación.*

Aún cuando las constantes de tiempo para la desactivación de los canales mutados, en general, se enlentecieron con respecto al canal control (ver tabla II), fue imposible establecer una correspondencia periódica entre este parámetro con respecto a la restauración de aminoácidos en el lazo S3-S4. Este resultado es posible explicarlo ya que, a diferencia de las medidas obtenidas a partir de la constante de tiempo para la activación y  $V_{1/2}$ , este parámetro ( $\tau_{\text{desact.}}$ ) no está directamente relacionado con el movimiento de los sensores de voltaje en el canal *Shaker* (Zagotta y col., 1994a).

1.4. *Diferentes combinaciones aminoacídicas en el lazo S3-S4 modifican las constantes de activación y  $V_{1/2}$*

En la región restablecida de 5 aminoácidos o menos en el lazo S3-S4, las cinéticas de apertura y la dependencia de voltaje de los canales están determinadas, no sólo por la longitud sino también por el tipo de aminoácidos que se encuentran en esta región. Dos casos asombrosos lo constituyen las parejas de mutantes MSLAI con VVLAI y AI con VV. En ambos casos los mutantes que contienen VV poseen cinéticas más rápidas (ver Tabla II), mientras que los mutantes MSLAI y AI muestran una activación muy lenta. La posición de los aminoácidos VV es también importante pues el mutante MSLVV es tan lento como MSLAI. Si el segmento aminoacídico introducido en la región de delección estudiada del lazo S3-S4 es mayor, en largo, que 6 aminoácidos los canales producidos presentan cinéticas de activación muy similares al canal control que es independiente de la composición de aminoácidos. Una posible explicación a estos resultados sería suponer que el S4 del canal *Shaker* es una  $\alpha$ -hélice que se extiende por su extremo N-terminal hasta al residuo Ala-355, por lo menos. Pero en realidad, aún no existe un consenso sobre los límites del lazo S3-S4.



Si comparamos los mutantes que poseen dos aminoácidos en el lazo S3-S4, VV y AI, encontramos grandes diferencias en cuanto a su cinética de activación. En particular, el mutante AI es el más lento de los mutantes estudiados, a diferencia del mutante VV que es el más rápido y parecido al control. Una explicación a este resultado se obtiene al comparar la tendencia de formar  $\alpha$ -hélices, de los aminoácidos del lazo. Según el método de Chou y Fasman, que determina el índice de probabilidad de formar  $\alpha$ -hélices a partir de las bases de datos de estructuras cristalizadas, se encontró que la alanina presenta una gran tendencia a formar  $\alpha$ -hélices, a diferencia de la valina que presenta una menor probabilidad de formar estructuras helicoidales. De esta forma en la mutación AI, la alanina favorecería una estructura de  $\alpha$ -hélice, la cual se debe desenrollar durante la activación del canal (según el modelo propuesto más adelante) a diferencia de la mutación VV que es indiferente a  $\alpha$ -hélice, por lo que se necesitaría aplicar menor energía para su activación en comparación con la necesaria para el mutante AI.

### 1.5. Definición del lazo S3-S4

De acuerdo a Wallner y col. (1996), el lazo S3-S4 se extiende entre los aminoácidos Val-330 e Ile-360. Al comienzo de este trabajo, esta era la propuesta topológica más reciente. Por ello, fue tomada como la base para el diseño y nomenclatura de los diferentes mutantes, estudiados en esta tesis. Otros investigadores han propuesto que el inicio del lazo es el Glu-333 y su término la Ser-356 (Kamb y col., 1988; Schwarz y col., 1988, Mathur y col., 1997). Sin embargo, Shih y Goldin (1997) señalan que se extiende al menos entre Glu-333 y Met-356, pero añaden que el lazo se puede extender más allá pues, la inserción del epitopo Flag después del residuo Val-363 no altera la función del canal. Recientemente, luego de la cristalización del canal KvAP (Jiang y col., 2003a), se estableció un alineamiento para el canal *Shaker* con el que la mayoría de los investigadores ha trabajado en los últimos dos años. En esta propuesta de estructura primaria, el lazo S3-S4, se extiende desde el Glutamato 333 hasta la Isoleucina 359 (Jiang y col., 2003a). Como discutimos anteriormente nuestros resultados sugieren que el lazo S3-S4 comienza en el Glu-333 (como veremos más adelante) y se extiende hasta la Ala 355. Esta propuesta se basa en colocar toda región

helicoidal como parte del segmento de transmembrana más cercano, ya sea el segmento S3 ó el segmento S4.

Otra posibilidad es, simplemente, que esta región con estructura de  $\alpha$ -hélice se encuentre realmente localizada en el lazo y que, incluso, se extienda más allá de la Met-356 hasta los residuos Ser-351, Ser-352 y Asn-353 descritos por Cha y col. (1999). El hecho de no encontrar periodicidad hasta estos residuos, se puede deber a que la metodología de delección de residuos aminoacídicos tal vez no posee la sensibilidad necesaria para detectar cambios más allá de 6 aminoácidos en el lazo S3-S4.

#### *1.6. Modelo estructural para la distribución periódica en el extremo C-terminal del lazo S3-S4*

Un modelo molecular que reproduce la periodicidad observada en las constantes de activación y en los  $V_{1/2}$ , cuando se restauran aminoácidos por el extremo C-terminal del lazo S3-S4 se muestra en la figura 41. En él se supone que el segmento S4 tiene una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice (Lismerin y col., 2000) y se muestra una visión del S4 desde el lado extracelular. La idea central de este modelo es que la  $\alpha$ -hélice del S4 rota durante la activación del canal (Cha y col., 1999; Glauner y col., 1999).

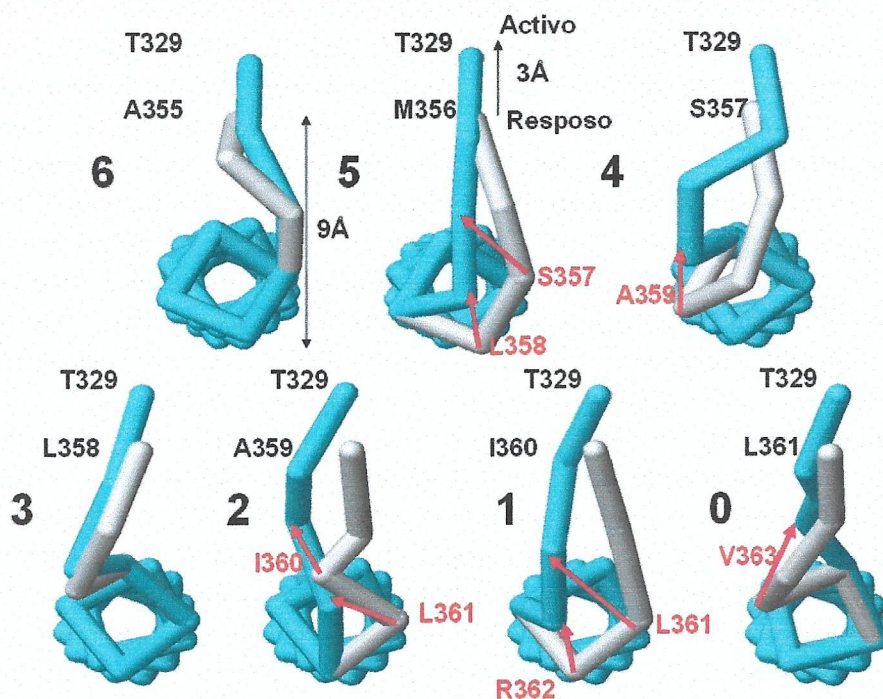


Figura 41. Modelo molecular que satisface la periodicidad encontrada a partir de las constantes de tiempo y las  $V_{1/2}$  en función de la cantidad de aminoácidos restaurados en la región C-terminal del lazo S3-S4. La figura representa una vista superior desde el lado extracelular para el trazo que une los carbonos alfa del S4 (sensor) y el lazo S3-S4 en los 7 diferentes mutantes, en los estados de reposo (gris) y activo (azul). Los modelos fueron creados a partir del “Swiss-PDB viewer”, liberados por “Glaxo Welcome Experimental Research” en Génova. ([www.expasy.chyspdbvymainpage.html](http://www.expasy.chyspdbvymainpage.html)). Las minimizaciones de energía se realizaron utilizando la implementación del campo de fuerza del GROMOS 96, del visualizador “Swiss-PDB”. Las estructuras fueron preparadas bajo el WEBLAB VIEWERPRO, obtenidas del “Molecular Simulations”, San Diego ([www.msi.com](http://www.msi.com)). Estas minimizaciones de energía fueron hechas usando un modelo de  $\alpha$ -hélice de S4 que incluía las cadenas laterales de los aminoácidos.

En el modelo (Figura 41), la rotación se ha hecho equivalente a un aumento en la distancia (3Å) que separa S3 de S4 manteniendo el segmento S3 fijo. Este desplazamiento puede ser una forma particular de mover el S4 lejos del

S3, permaneciendo este último inmóvil (como veremos más adelante). La Thr-329 que aparece en la parte superior de todos los modelos es el último aminoácido del segmento S3, según el alineamiento de Wallner y col. (1996). El residuo siguiente es el primero del lazo S3-S4 y está especificado en la figura 41, por ejemplo Ala-355 para el mutante de delección con seis aminoácidos en el lazo S3-S4. La activación del sensor de potencial se simuló para un desplazamiento de 3 Å del S4 respecto al S3. Esta distancia de 3Å fue tomada considerando que, cuando el canal transita del estado cerrado al estado abierto, hay un movimiento dependiente de potencial de  $\sim 3,2\text{Å}$  entre residuos de subunidades contiguas (Cha y col. 1999). En la figura 41, la estructura en el estado activado está en azul, mientras que la del estado en reposo es gris. La transición desde el estado de reposo al activado, para los mutantes de delección con 6 o 3 residuos en el lazo, sólo se acompaña de cambios en los ángulos dihédricos de los residuos que forman el lazo. Para los otros mutantes, la activación (movimiento del S4) conlleva la disociación de uno o dos residuos de la  $\alpha$ -hélice del S4. Estos residuos que se disocian durante la activación están marcados en rojo y una flecha roja marca su desplazamiento. El modelo predice una activación rápida para los mutantes con 6 y 3 aminoácidos en el lazo. Para los otros

mutantes (0, 1, 2, 4 y 5aa) se predice una activación más lenta, a causa de la energía extra que se necesita para romper los puentes de hidrógeno que estabilizan los residuos en la estructura de  $\alpha$ -hélice. De acuerdo a este modelo, se necesitan romper dos enlaces de hidrógeno para los mutantes con 5, 2 y 1 aminoácidos en el lazo cuando estos canales se activan. En cambio, es necesario romper sólo un puente de hidrógeno en la activación de los mutantes de 4 y 0 aminoácidos en el lazo.

La energía necesaria para romper un enlace de hidrógeno es de 1-2 kcal/mol. Para comparar las predicciones del modelo con los datos experimentales obtenidos, se supuso que el  $\Delta\Delta G^*$  representa la energía necesaria para romper los enlaces de hidrógeno en la  $\alpha$ -hélice. En un razonable ajuste con el modelo, los datos experimentales permiten concluir que el proceso de activación debe involucrar la ruptura de unos dos enlaces de hidrógeno para los mutantes MSLAI, AI e I; 1,3 enlaces de hidrógeno para SLAI y 1,5 puentes de hidrógeno para el mutante 0aa (Albert y col., 1989).

Por otro lado, el modelo desarrollado entrega una explicación simple para la disminución de la carga de compuerta en el mutante 0aa pues en este caso el



residuo cargado R362 pasaría a formar parte del lazo S3-S4 por lo que no contribuiría a las cargas de compuerta.

## **2. Papel del segmento S3 en el canal de $K^+$ Shaker.**

La delección del lazo S3-S4 y parte del segmento S3b, trajo como consecuencia la no funcionalidad del canal *Shaker*. Como ya se señaló el límite del N-terminal del lazo S3-S4 aún no está claro. Según la topología de Wallner y col. (1996) la secuencia VVA es parte del lazo S3-S4. Sin embargo, estudios posteriores ubican esta secuencia de aminoácidos como parte del S3 (Li-Smerin y Swartz, 200; Jiang y col., 2003a). Es por ello que en el futuro, nos referiremos al S3 cuando hablemos de esta zona del canal. En particular, la nombraremos como S3b, puesto que existe una prolina en la mitad del S3 que lo divide en S3b (desde la prolina hacia C-terminal del segmento) y en S3a (desde la prolina hacia el N-terminal del segmento S3).

Como ya mencionamos, al eliminar parte del S3b, hasta la leucina ubicada en la posición 327, la probabilidad máxima de encontrar los canales abiertos disminuyó a la mitad. Este hecho conjuntamente con la no funcionalidad de la proteína *Shaker* truncada, al continuar eliminando parte del S3b, nos sugiere que esta fracción del segmento S3 podría desplazarse durante la activación del canal. Sin embargo; al eliminar totalmente el segmento S3b y

unir el segmento S3a con el N-terminal del segmento S4 se recuperó la funcionalidad de esta proteína truncada (Figura 32, Resultados). Este resultado nos sugiere que la presencia del segmento S3b no es vital para la funcionalidad de la proteína canal.

### 2.1. Periodicidad en el S3b a partir de las constantes de tiempo de activación ( $\tau_{act}$ )

Un análisis similar al realizado para el C-terminal del lazo S3-S4 se realizó con las mutantes de delección en el S3b. Nosotros encontramos una posible periodicidad entre las constantes de tiempo de activación y el número de aminoácidos en dos regiones de esta secuencia. Una región desde la alanina 332 hasta la treonina 329, y otra a partir de esta posición hasta la leucina 327, pues, mutantes de supresiones más allá de esta posición no reportaron expresión de sus corrientes, frente a protocolos despolarización (ver Figura 34 de alineamiento de *Shaker* con KvAP en Resultados, para mayor claridad)

Aún cuando son pocos los puntos para definir dos estados periódicos diferentes (ver Figura 29, Resultados), nosotros sugerimos que en la treonina 329 hay un punto de quiebre de nuestra  $\alpha$ -hélice. Esto parecería extraño, pues generalmente, los puntos de quiebre de  $\alpha$ -hélice están

asociados a residuos prolina (Alberts y col., 1989). Una explicación a este hecho se detalla en O'Neil y col. (1990) quienes establecieron que residuos con cadenas laterales ramificadas en la posición  $\beta$ , como la Thr, desestabilizan la conformación de  $\alpha$ -hélice. En el caso de la Thr se establece una repulsión estérica entre el sustituyente en la posición  $\gamma$  de la cadena lateral y el oxígeno carbonílico de la vuelta precedente de la  $\alpha$ -hélice, lo cual produce que la cadena lateral adopte un ángulo de torsión menor al óptimo.

Nuestra predicción es que si caracterizamos de igual manera los mutantes después de la alanina 332 hasta el glutamato 335, (como el primer aminoácido del N-terminal del S3b) éstos podrían completar la cantidad de puntos suficientes para describir con claridad el comportamiento periódico que se muestra en la figura 29 de la sección de Resultados.

A fin de comprobar la hipótesis de que el S3b podría estar en contacto con el solvente, ya fuera por el lado extracelular (poco probable como discutimos anteriormente) ó en contacto con el solvente, pero en una cavidad (como pensamos), se recurrió a la colaboración que existe entre nuestro laboratorio y el grupo dirigido por el Dr. Danilo González, experto en el manejo de programas computacionales para el estudio de estructuras

aminoácido es el punto exacto en el cual la periodicidad encontrada a partir de los mutantes de delección cambia su periodicidad (ver Figura 29, Resultados). Más aún, el ángulo de desfase entre las dos hélices medido a partir de la simulación fue de  $152^\circ \pm 8^\circ$ . Este desfase es prácticamente el mismo que encontramos por la metodología de delección del S3b ( $159^\circ \pm 3^\circ$ ) (ver Figura 29, Resultados). Estos resultados, conjuntamente con los resultados de la periodicidad en dos niveles de energía para las constantes de activación de los mutantes de delección del S3b, nos sugiere que el S3b tiene un punto de quiebre en la treonina 329.

## *2.2. Accesibilidad de residuos de cisteínas en el S3 a MTSET.*

### *2.2.1. Mutantes de Shaker con sustituciones por cisteínas en el S3b reaccionan a MTSET.*

Estos experimentos estuvieron encaminados a resolver la capacidad que presentan los aminoácidos que forman el S3b de reaccionar con el MTSET. Nosotros suponíamos que la accesibilidad no sería igual para todos los aminoácidos del S3b, ya que de acuerdo a los resultados de Li-Smerin y Swartz (2001), al menos parte de él estaría en contacto con la membrana. Contrariamente a este supuesto, las cisteínas en todas las posiciones que se

estudiaron (A328C, T326C, F324C, I321C e I315C) fueron accesibles al reactivo, tanto en la conformación abierta como en la cerrada del canal. Esto sugiere que el solvente siempre está en contacto con estas posiciones en la proteína.

Una posible explicación a este hecho, sería que el lazo S3-S4 comenzaría, por su N-terminal, en la posición Iso-315. En otras palabras, todo el segmento S3b estaría dispuesto hacia el lado extracelular, formando parte de un gran lazo S3-S4, desde la posición 315 hasta la 360. Sin embargo, un análisis más cuantitativo de los valores de las constantes de reacción a MTSET refleja que las constantes más elevadas son de  $k=2\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como los valores de las constantes de reacción con cisteínas libres para todos los reactivos metanotiosulfónicos, como el MTSET, son del orden de  $10^2\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Del Camino y Yellen, 2001), es probable que exista cierta restricción al acceso de estas posiciones en la proteína. Es por ello que una posibilidad más real, atendiendo a la diferencia en 2 ordenes de magnitud de las constantes de reacción con respecto al valor de  $10^2\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , sería suponer que esta zona del S3b se encuentra formando parte de una cavidad acuosa en el interior de la matriz lipídica, con grietas que permiten al

MTSET llegar a todos los residuos de cisteína, independientemente de la posición pero con una gran restricción estérica.

Sobre la base de esta propuesta estructural y otros antecedentes de la literatura, también se realizó un “docking” entre el reactivo MTSET y el S3 con las sustituciones por cisteínas estudiadas en los experimentos electrofisiológicos. Los resultados de esta simulación mostraron que, el MTSET puede acceder hasta la posición 315 en el S3, a pesar de que la simulación fue hecha colocando el S3 en el interior de la membrana. La propuesta estructural para esta región genera una cavidad con grietas espontáneamente. Este hallazgo apoya tanto los experimentos de accesibilidad como nuestra propuesta de que el S3b está ubicado en una cavidad, conjuntamente con otros grupos de investigadores (Li-smerin y Swartz, 2001; Nguyen y Horn, 2002).

### *2.2.2. Mutantes de Shaker con lazo corto y sustituciones por cisteínas en el S3b reaccionan con MTSET.*

El alineamiento del canal KvAP con el canal *Shaker*, mostró que la zona propuesta para el sensor en KvAP, está compuesta por un lazo S3-S4 muy pequeño de 3 aa (con una secuencia LGL, ver Figura 34, Resultados). Esta



razón nos hizo suponer que un lazo S3-S4 de secuencia LAI, en el canal de  $K^+$  *Shaker* (ver alineamiento), podría estructurar al sensor de voltaje de forma similar a la propuesta de paleta ó remo, para el canal KvAP. De esta forma, todos los canales dependientes de voltaje, con un lazo S3-S4 muy corto, presentarían al sensor como un remo ó paleta, formado por parte del segmento S3 (S3b), el lazo S3-S4 y el segmento S4. Este “remo” se encontraría, como en el canal KvAP, en el interior de la membrana, cercano a la superficie intracelular, cuando el canal está cerrado. El desplazamiento de esta estructura cargada a través de la membrana, hacia el lado extracelular, acoplaría la energía eléctrica contenida en el campo eléctrico a la energía mecánica necesaria para abrir el canal.

Nuestros resultados con los mutantes de cisteínas en las mismas posiciones que las anteriores mutantes, pero con lazo S3-S4 corto reportaron similares constantes de reacción con MTSET, entre 1-0,5  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (ver Figura 37, Resultados). Estos resultados fueron muy similares tanto para el estado cerrado como para el estado abierto del canal.

Estos resultados, si bien no son concluyentes, en cuanto al movimiento del S3b, indican que incluso en posiciones tan distantes de la cara externa del canal como la posición I-315, pueden ser accedidas por el MTSET. Por

tanto, la hipótesis de que esta zona se encuentre en el interior de la membrana es muy poco probable.

Sin embargo, los experimentos de accesibilidad no nos dan una idea sobre el posible desplazamiento del S3. Por ello, decidimos reemplazar residuos en este segmento por aminoácidos positivos, para evaluar el posible desplazamiento del segmento S3b.

### *2.3. Invariabilidad del número de cargas equivalentes de compuerta para el mutante con S3b cargado: T326R.*

Un sustento experimental al supuesto de que el S3 no se mueve junto al S4, a través del campo eléctrico aplicado, lo entregan los resultados de las mediciones de la carga de compuerta en los mutantes T326R en los cuales se adicionó una carga al S3b. Si efectivamente el S3b se mueve a través del campo eléctrico se espera encontrar un aumento por encima de 12-13 cargas de compuerta para este mutante. Este resultado conjuntamente a los resultados de accesibilidad, y los resultados de la recuperación de la actividad del canal al eliminar al S3b, nos sugieren fuertemente que el S3b, en el canal *Shaker*, no parece ser un componente importante en la estructura del sensor de potencial, a diferencia del canal KvAP.

### **3. Modelo de paleta ó remo para el canal de $K^+$ Shaker**

Nuestros resultados no son compatibles con el modelo de sensor para el canal KvAP, propuesto por el grupo del Dr. Mackinnon luego de la obtención de la primera estructura cristalina que incluye al sensor de potencial (Jiang y col., 2003b) y es incompatible con un modelo de desplazamiento de 20 Å para el sensor de voltaje, en el canal *Shaker*.

En contraste, es consistente con los resultados obtenidos por otros investigadores que rechazan esta propuesta de composición y desplazamiento del sensor. Entre ellos se destacan estudios de accesibilidad con MTSET (Larsson y col., 1996; Gandhi y col., 2003; Nguyen y Horn, 2002; Latorre y col., 2003).

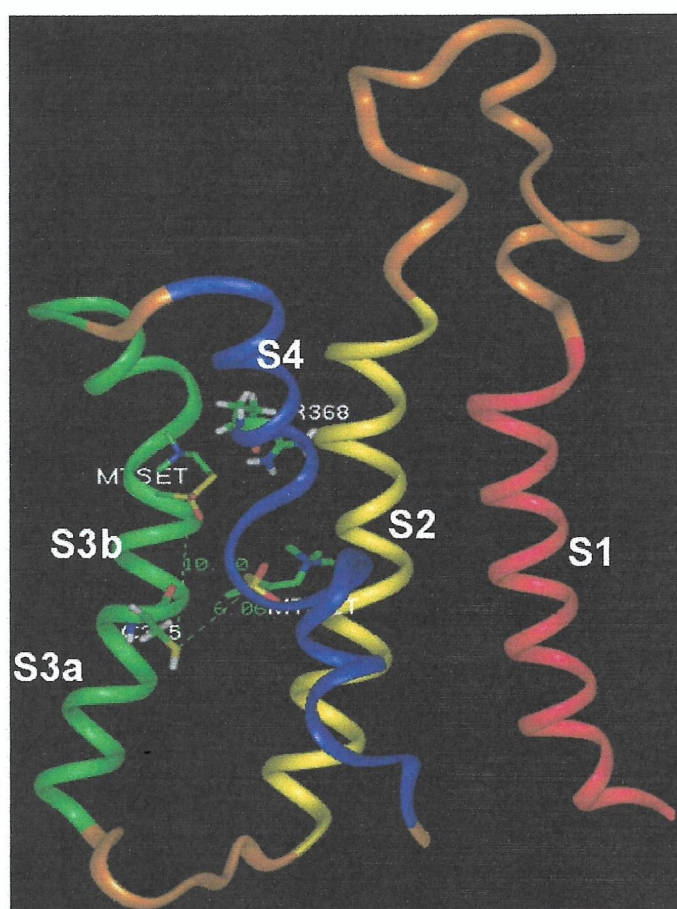
Otros experimentos como la interacción de la hanatoxina con el supuesto “paddle sensor”, en canales Kv, han mostrado una clara unión de la toxina al sensor, para potenciales muy negativos, en los que el canal está cerrado. Esto hace suponer que esta región está siempre accesible, no sólo por reactivos metanosulfónicos como MTSET, sino también por toxinas (Lee y col., 2003).

Sobre la base de evidencias experimentales de datos estructurales y electrofisiológicos, conjuntamente con los resultados obtenidos en esta tesis



se construyó un modelo para la región que involucra los tres componentes estructurales que forman la paleta ó remo: el segmento S3 (S3b), el lazo S3-S4 y el segmento S4.

En la figura 43 se muestra un modelo para esta región de la proteína *Shaker*. Como se aprecia en dicha figura, el segmento S3 esta formando una cavidad acuosa en el interior de la membrana con pequeñas grietas donde se puede acceder desde el líquido extracelular.



**Figura 43. Modelo de cavidad para la región comprendida entre los segmentos S3, el lazo S3-S4 y el segmento S4.** Esquema de la región que sensa el voltaje en la proteína *Shaker* con las conformaciones de mas baja energía de MTSET. Esta región es mostrada en formato de cintas con S1 rojo, S2 amarillo, S3 verde y S4 en azul. Se muestra además las cadenas laterales de los aminoácidos C315 y R368. Las moléculas de MTSET usan los colores estándar IUPAC para sus átomos (C gris, N azul, O rojo, S amarillo). En la figura se destaca la distancia de 6 Å para la interacción de MTSET con la posición I315 y cercanía de esta molécula con la posición R368 del segmento S4.

Esta cavidad se formó espontáneamente al colocar la secuencia aminoacídica de los segmentos S3 y S4. Como se puede apreciar, el lazo utilizado para unir estos segmentos fue muy pequeño, de apenas 3 aa (LAI). A pesar de esta modificación estructural la cavidad se mantuvo inalterable si la comparamos con una cavidad que contenía un lazo largo de secuencia aminoacídica similar al control. Por otra parte, al colocar una cisteína en la posición más interna (I315) y ubicar una molécula de MTSET, encontramos que la distancia entre los átomos de azufre de ambos no excede los 6 Å, luego de realizado un “docking” para ambas moléculas.

A diferencia del modelo de paleta este modelo explica como las cargas presentes en el segmento S4 (R362, R365, R368 y R371) pueden estar en el interior de la membrana y están protegidas de su interacción energéticamente desfavorable con la matriz lipídica pues permite la interacción de las cargas con el medio acuoso de la cavidad.

Sin embargo, aún cuando nuestros experimentos de accesibilidad y en particular, el no incremento del número total de carga de compuesta al cargar al S3b, son incompatibles con el modelo de activación propuesto por el grupo de Mackinnon y recientemente apoyado por experimentos de microscopía electrónica (Jiang y col., 2004), como una propuesta general de



mecanismo para todos los canales dependientes de voltaje (como el canal *Shaker*), nosotros creemos que el canal KvAP es una excepción dentro de esta familia de canales de iones y más aún es necesario otros estudios para determinar con claridad el mecanismo activación de estos canales.

Es por ello que, como proyección de este trabajo he decidido realizar mis estudios de postdoctorado en el laboratorio del Dr. Eduardo Perozo en la Universidad de Virginia. Nuestro futuro proyecto tiene como estrategia realizar estudios cinéticos de dinámica molecular de estructuras como el canal KvAP, y en particular, tratar de determinar exactamente el movimiento de cada aminoácido de la estructura propuesta como sensor, a partir de técnicas espectroscópicas como resonancia nuclear, a fin de trazar la trayectoria exacta de cada posición aminacídica dentro de la proteína durante la apertura y cierre del canal, para describir el mecanismo de activación de forma directa.

Por todo lo anteriormente discutido, nosotros pensamos que aún no es posible establecer una generalidad en cuanto al mecanismo de desplazamiento del sensor para canales Kv y así el mecanismo de activación para el canal *Shaker*, sigue siendo una interrogante.



## Conclusiones

1. La eliminación total del lazo S3-S4 en el canal de potasio *Shaker*, disminuye a la mitad el número equivalente de cargas de compuerta, sin modificación de la probabilidad máxima de apertura.
2. La longitud del lazo S3-S4 y la naturaleza de los residuos aminoacídicos que lo componen, modifican tanto las características cinéticas como las del equilibrio del canal *Shaker*. Sin embargo; una longitud de 3aa en el lazo es suficiente para recuperar las características del canal control.
3. Tanto las constantes de activación, como los puntos medios de las curvas de activación, arrojaron una relación periódica con respecto a la longitud del lazo S3-S4 en su extremo C-terminal (no mayor de 6aa en su composición). Esta periodicidad es típica de  $\alpha$ -hélices. Por el contrario, las constantes de desactivación no reflejaron dicho comportamiento.
4. Las posiciones 315, 321, 324, 326 y 328 en el segmento S3 (S3b), son accesibles al reactivo MTSET tanto en el estado abierto como el cerrado del canal, y esta accesibilidad es independiente de la longitud del lazo S3-S4.

5. La sustitución por arginina en la posición 324 del canal *Shaker*, no cambia el número de cargas de compuerta durante la activación del canal. Este resultado sugiere que el segmento S3 se desplaza muy poco durante la activación del canal ó que las cargas introducidas no se están moviendo dentro del campo eléctrico.
6. El segmento S3b no es un componente del sensor de voltaje en el canal *Shaker*, pero parece ser un soporte estructural en la funcionalidad de estas proteínas canales.
7. Nuestros resultados sugieren que el modelo de “remo ó paleta” propuesto para el canal, KvAP, por el grupo del Dr. MacKinnon, no es aplicable para el canal de potasio tipo *Shaker*. En contraste, un modelo de desplazamiento muy pequeño para el sensor de voltaje, permite explicar los resultados obtenidos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aggarwal SK, MacKinnon R. (1996) **Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel.** *Neuron*, 16:1169-1177.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson J.D (1989) **Molecular Cell Biology.** Editorial Garland Publishing, Inc.
- Almers, W. (1978) **Gating currents and charge movements in excitable membranes.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 82:96-190.
- Alvarez, O., Gonzalez, C., And Latorre R. (2002) **Counting ionic channel. Theoretical basis and application in noise analysis.** *Advances in Physiology Education*. 26: 327- 341.
- Armstrong, C. M. y Bezanilla, F. (1973) **Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels.** *Nature*. 242: 459-461.
- Bell, DC., Yao, H., Saenger, RC., Riley, JH. y Siegelbaum, SA. (2004) **Changes in local S4 environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels.** *J. Gen. Physiol.*, 123:5-19.
- Bezanilla F, Perozo E, Papazian DM y Stefani E. (1991) **Molecular basis of gating charge immobilization in *Shaker* potassium channels.** *Science*; 254 (5032):679-83.
- Bezanilla, F. (2000) **The Voltage Sensor in Voltage Dependent Ion Channels.** *Physiol Rev.*, 80:555-592.
- Bezanilla, F. (2002) **Voltage Sensor Movements.** *J. Gen. Physiol.*, 120:465-473.
- Catterall WA (1986) **Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels.** *Ann. Rev. Biochem.* 55:953-985.

Cha A y Bezanilla F. (1998) **Structural Implications of Fluorescence Quenching in the *Shaker* K<sup>+</sup> Channel.** *J. Gen. Physiol.*; 112:391-408.

Cha A, Snyder GE, Selvin PR y Bezanilla F. (1999) **Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy.** *Nature*, 402:809-813.

Del Camino D y Yellen G (2001) **Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel.** *Neuron*. 32(4):649-56.

Díaz L, Meera P, Amigo J, Stefani E, Alvarez O, Toro L y Latorre R. (1998) **Role of the S4 Segment in a Voltage-dependent Calcium-sensitive Potassium (hSlo) Channel** *J. Biol. Chem.* 273(49):32430-36.

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT y MacKinnon R. (1998) **The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity.** *Science*, 280:69-77.

Durell, S. R. y Guy, H. R. (1992) **Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels.** *Biophys. J.*, 62:238-250.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT y MacKinnon R. (2002) **X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity.** *Nature*. 415(6869):287-94.

Gandhi CS, Loots E, Isacoff EY. (2000) **Reconstructing voltage sensor-pore interaction from a fluorescence scan of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel.** *Neuron* 27(3):585-95.

Gandhi CS, Clark E, Loots E, Pralle A e Isacoff EY. (2003) **The orientation and molecular movement of a K<sup>+</sup> channel voltage-sensing domain.** *Neuron*. 40(3):515-25.

Guy HR y Seetharamulu P (1986) **Molecular model of the action potential sodium channel.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(2):508-12.

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ (1981) **Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell and cell free membrane patches.** *Pflügers Arch.* 391:85-100.
- Hilgemann DW (1989) **Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents.** *Pflügers Arch.* 415:247-249.
- Hille, B y Campbell DT (1976) **An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers.** *J Gen Physiol.* 67(3):265-93.
- Hille B: **Ion channels of excitable membranes** second. Ed. Sunderland, MA: Sinauer; 2001.
- Hodgkin A y Huxley A. (1952) **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.** *J. Physiol*, 117:500-544.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK y Pease LR (1989) **Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension.** *Gene.* 787: 61-68
- Hong KH y Miller C: **The Lipid-Protein Interface of a *Shaker* K<sup>+</sup> Channel.** *J. Gen. Physiol.* 1999, 115:51-58.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT y MacKinnon R. (2003a) **X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel.** *Nature*, 423:33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. (2003b) **The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel.** *Nature*, 423:42-48.
- Jiang QX, Wang DN, MacKinnon R. (2004) **Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in an open conformation.** *Nature*; 430(7001):806-10.

Kamb, A., Tseng-Crank, J. y Tanouye, M. A. (1988) **Multiple products of the *Drosophila Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity.** *Neuron* 1, 421–430.

Keynes, R. D. y E. Rojas. (1974) **Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon.** *J. Physiol. (Lond.)*, 239:393-434.

Landt O, Grunert HP, y Hahn U (1990) **A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction.** *Gene* 96:125-128.

Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS e Isacoff EY: **Transmembrane movement of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel S4.** *Neuron* 1996, 16:387-397.

Latorre R, Olcese R, Basso C, Gonzalez C, Muñoz F, Cosmelli D y Alvarez O. **Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the Arabidopsis inward rectifier K<sup>+</sup> channel KAT1,** *J. Gen. Physiol.* 2003,122(4):459-69.

Ledwell JL y Aldrich RW (1999) **Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation.** *J Gen Physiol.* 113(3):389-414.

Lee HL, Wang JM y Swartz KJ. **Interaction between Extracellular Hanatoxin and the Resting Conformation of the Voltage-Sensor Paddle in Kv Channels** *Neuron* 2003; 40:527-536.

Liman ER, Hess P, Weaver F y Koren G. (1991) **Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel.** *Nature*, 353:752-756.

Logothetis DE, Movahedi S, Satler C, Lindpaintner K y Nadal-Ginard B. (1992) **Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel result in corresponding decreases in gating charge.** *Neuron*, 8: 531-540.



- Li-Smerin, Y., Hackos, D. H. y Swartz, K. J.  **$\alpha$ -Helical Structural Elements within the Voltage-sensing Domains of a  $K^+$  Channel.** (2000) *J. Gen. Physiol.* 115,33–49.
- Li-Smerin, Y. y Swartz, K. J. **Helical Structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels.** (2001) *J. Gen. Physiol.* 117,205–218.
- Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY. (1996) **Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating.** *Science*, 271:213-216.
- Mathur, R., Zheng, J., Yan, Y. y Sigworth, F. J. (1997) **Role of the S3-S4 linker in *Shaker* potassium channel activation.** *J. Gen. Physiol.* 109,191–199.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y y MacKinnon R. (2001) **Energetic optimization of ion conduction rate by the  $K^+$  selectivity filter.** *Nature.*; 414(6859):37-42.
- Nguyen TP y Horn R. **Movement and crevices around a sodium channel S3 segment.** *J. Gen. Physiol.* 2002; 120(3):419-36.
- Noceti F, Baldelli P, Wei X, Qin N, Toro L, Birnbaumer L, Stefani E: **Effective gating charges per channel in voltage-dependent  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels.** *J. Gen. Physiol.* 1996, 108:143-155.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, y cols. (1984) **Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence.** *Nature*, 312:121-127.
- O'Neil, KT y Degrado, WF.(1990) **A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids.** *Science.*250(4981):646-51.

- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. (1991) **Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence.** *Nature*, 349:305-310.
- Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y, Wainstock DH. (1995) **Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in *Shaker* K<sup>+</sup> channel.** *Neuron*, 14:1293-1301.
- Perozo E, Santacruz-Toloza L, Stefani E, Bezanilla F, Papazian DM. **S4 mutations alter gating currents of *Shaker* K<sup>+</sup> channels.** *Biophysical Journal* 1994, 66:345-354.
- Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R. (2003) **Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K<sup>+</sup> channel.** *Nature*; 422(6928):180-185.
- Sakmann B y Neher E (1995) **Single Channel Recording** 2nd edition, *Plenum Press*.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) **Molecular Cloning. A laboratory manual.** 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Press.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ: **The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels.** *Science* 1992, 255:1712-1715.
- Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. (1996) **Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel.** *Neuron*, 16:1159-1167.
- Shih, T. M. y Goldin, A. L. (1997) **Topology of the *Shaker* potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions.** *J. Cell Biol.* 136, 1037–1045.
- Sigg, D and Bezanilla, F. (1997) **Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity activation,** *J. Gen.Physiol.* 109, 27-39.

Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL y Aldrich RW. (1998a) **Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation.** *J Gen Physiol* 111(3):421-39.

Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL y Aldrich RW. (1998b) **Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation.** *J Gen Physiol* 111(3):399-420.

Starace DM, Stefani E, Bezanilla F. (1997) **Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel.** *Neuron*, 19:1319-1327.

Starace DM, Bezanilla F. (2001) **Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker K<sup>+</sup> channel.** *J. Gen. Physiol.*, 117:469-490.

Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. (1989) **Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel.** *Nature*, 339:597-603.

Taglialatela 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(1):78-82.

Tiwari-Woodruff SK, Schulteis CT, Mock AF, Papazian DM. (1997) **Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K<sup>+</sup> channels subunits.** *Biophys.J.* 72:1489-1500.

Vemana, S., Pandey, S. y Larsson, HP. (2004) **S4 movement in a mammalian HCN channel.** *J. Gen. Physiol.*, 123:21-32.

Wallner, M., Meera, P. y Toro, L. (1996). **Determinant for b-subunit regulation in high conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N-terminus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14922-14927.

Yang N y Horn R: **Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels.** *Neuron* 1995, 15:213-218.

Yang, N., George AL Jr. y Horn R. (1996) **Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels.** *Neuron*, 16(1):113-122.

Yusaf SP, Wray D y Sivaprasadarao A. (1996) **Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel.** *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 433:91-97.

Zagotta WN, Hoshi T, Dittman J, Aldrich RW. (1994a) **Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway.** *J Gen Physiol.* 103(2):279-319.

Zagotta WN, Hoshi T, Dittman J, Aldrich RW. (1994b) **Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models of activation.** *J Gen Physiol.* 103(2):279-319.

## ANEXO I

Lista de artículos publicados durante el trabajo de tesis doctoral.

**A. Publicaciones generadas a partir del manuscrito de tesis. (A sugerencia de la comisión evaluadora se adjuntan copias de los artículos)**

1. **Gonzalez C**; Rossenman E; Bezanilla F; Alvarez O and Latorre R. Modulation of *Shaker* K<sup>+</sup> channel gating kinetic by S3-S4 linker. *Journal of General Physiology* (2000), vol 115; 193-207.
2. **Gonzalez C**; Rossenman E; Bezanilla F; Alvarez O and Latorre R. Periodic Perturbations in *Shaker* K<sup>+</sup> Channel Gating Kinetics by Deletions in the S3-S4 Linker. *Proceeding National Academy Sciences* (2001), vol 98; 9617-9623.
3. Alvarez O; **Gonzalez C** and Latorre R. Counting ionic channels. Theoretical basis and application in noise analysis. *Advances in Physiology Education*. (2002). 26: 327- 341.
4. Latorre R., Muñoz F.; **Gonzalez C** and Cosmelli D. Structure and Function of Potassium Channels in Plants: Some Inferences about the Molecular Origin of Inward Rectification in KAT1 Channels. *Molecular Membrane Biology*, (2003). 20: 19-25
5. Álvarez, O. Rosenmann, E; Bezanilla, F.; **González C** and Latorre, R. (2004). Helical nature of the voltage sensor. In: Transporters and Channels at 60. Sepúlveda, F. Editor. *Plenum Press, NY*.
6. **Gonzalez C**; Morera F; Rossenman E; Alvarez O and Latorre R. Testing the paddle model: state-dependent accessibility of S3 residues to a thiol reagent (en preparación para JBC).
7. **Gonzalez C**; Morera F; Rossenman E; Alvarez O and Latorre R. Effect of the deletions of the S3 segment in the *Shaker* K<sup>+</sup> channels activation kinetics. (en preparación).

**B. Otras Publicaciones durante este período:**

1. Soto M; **Gonzalez C**; Vergara C; and Latorre R.  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^+$  Channel Inhibition by Reactived Oxygen Species. *American Journal Cell Physiology*. (2002). 282: c461-c471.
2. Fernandez-Sanchez, E; Duconge, J; Surroca A.; Perdomo Y; **Gonzalez C** and Bécquer MA. Disposición Farmacocinética y Biodistribución del anticuerpo monoclonal ior EGF/R3 en Ratas, Conejos y Perros. *Acta Farm. Bonaerense*. (2002). 21: 245-253.
3. Hebeisen, S., Heidtmann, H., Cosmelli, D., **González, C.**, Poser, B., Latorre, R., Alvarez, O., Fahlke, C. Anion Permeation in Human ClC-4 channels. *Biophysical Journal*. (2003). 84: 2306-2318.
4. Latorre R., Olcese, R., Basso C.; **González C**; Muñoz F; Cosmelli D and Alvarez O. Molecular coupling between voltage sensor and pore opening in the *Arabidopsis* inward rectifier  $\text{K}^+$  channel KAT1. *Journal of General Physiology*. (2003). 122: 459-469.



# Periodic perturbations in *Shaker* K<sup>+</sup> channel gating kinetics by deletions in the S3–S4 linker

Carlos Gonzalez<sup>†</sup>, Eduardo Rosenman<sup>†</sup>, Francisco Bezanilla<sup>†\*</sup>, Osvaldo Alvarez<sup>2,5</sup>, and Ramon Latorre<sup>1,5,6,7</sup>

<sup>†</sup>Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia, Chile; <sup>5</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile; and <sup>2</sup>Departments of Physiology and Anesthesiology, University of California School of Medicine, Los Angeles, CA 90095

This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected on April 27, 1999.

Contributed by Ramon Latorre, June 18, 2001

Upon depolarization positive charges contained in the transmembrane segment S4 of voltage-dependent channels are displaced from the cytoplasmic to the external milieu. This charge movement leads to channel opening. In *Shaker* K<sup>+</sup> channels four positively charged arginines in the S4 domain are transferred from the internal to the external side of the channel during activation. The distance traveled by the S4 segment during activation is unknown, but large movements should be constrained by the S3–S4 linker. Constructing deletion mutants, we show that the activation time constant and the midpoint of the voltage activation curve of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel macroscopic currents becomes a periodic function of the S3–S4 linker length for linkers shorter than 7 aa residues. The periodicity is that typical of  $\alpha$ -helices. Moreover, a linker containing only 3 aa is enough to recover the wild-type phenotype. The deletion method revealed the importance of the S3–S4 linker in determining the channel gating kinetics and indicated that the  $\alpha$ -helical nature of S4 extends toward its N terminus. These results support the notion that a small displacement of the S4 segment suffices to displace the four gating charges involved in channel opening.

Voltage-gated ion channels are essential for information to flow without attenuation across the nervous system. These molecular sensors of transmembrane electric field changes are proteins made up of four homologous domains or subunits, each of which contain six transmembrane segments (1). The fourth segment (S4) contains several positively charged residues every third or fourth position and its displacement driven by the electric field initiates the events leading to channel opening (refs. 2–15; for reviews see refs. 16 and 17). Mutant *Shaker* K<sup>+</sup> channels in which arginines have been replaced by histidines display a passive proton transport across the membrane concomitant with channel activation (11). These experiments demonstrate that the charges contained in the S4 domain are relocated from the internal to the external aqueous environment of the channel during activation. The histidine mutagenesis results are consistent with a picture in which narrow vestibules line the S4 segment (11).

According to some models, the S4 segment moves during channel activation across the membrane as a sliding helix (18, 19). In these models the helical screw movement is normal to the lipid bilayer. Assuming that the S4 segment is  $\alpha$ -helical, the transfer of 10 aa residues in *Shaker* K<sup>+</sup> channel requires a displacement of 15 Å. On the other hand, several investigators have proposed that the electric field can be focused in a region of the membrane much narrower than the bilayer thickness. If this is the case, only small conformational changes of the voltage sensor would be necessary to translocate the gating charges through the entire electric field (e.g., ref. 16). Indeed, spectroscopic measurements indicate that voltage-dependent changes in intersubunit distance during channel activation are not larger than 4 Å (5, 7). The voltage-dependent distance changes are in almost perfect correlation with the changes in the amount of gating charge displaced by voltage (5). This finding is inconsistent with models that assume large displacements of S4 perpen-

dicular to the plane of the membrane. However, recent results aimed to localize the position of the extracellular end and the voltage-dependent movements of S4 were explained in terms of a large outward translation of the S4 (6, 20).

We previously reported that deletions of segments of the *Shaker* protein contained between domains S3 and S4 have profound effects on *Shaker* K<sup>+</sup> channel gating kinetics (21, 22). In that study the linker was defined as the stretch of amino acid contained between residues 330 and 360 (see ref. 23 and *Discussion*). We showed that although the number of gating charges per channel remains unmodified even in *Shaker* mutant channels containing S3–S4 linkers as short as 5 aa, the channel activation kinetics are 2 orders of magnitude slower (21). The successful expression of a mutant in which a stretch of 31 aa, *Shaker*H4 $\Delta$ (6–46) $\Delta$ (330–360), between S3 and S4 was removed is utterly inconsistent with models that proposed large displacements of the S4 domain (e.g., ref. 6). Because the boundaries of the transmembrane segments and loops are poorly defined, the linker definition we used (21) should be considered as purely operational. It is one of the aims of the present work to set approximate limits to N and C terminus of the S3–S4 linker.

In the present study, we investigate in detail the role of the protein segment comprised between valine 330 and isoleucine 360 by deleting this protein region and restoring one by one both from the N and the C terminus the deleted amino acid residues. The deletion method we used here unveiled a periodicity in the activation time constants and in the half activation voltages of the mutant channels consistent with a  $\alpha$ -helical structure of the N terminus of the S4 domain. The results also show that a very short amino acid domain suffices to recover the gating kinetics and voltage-dependent characteristic of the parent *Shaker*H4 $\Delta$ (6–46) K<sup>+</sup> channel. We conclude that a small movement of the voltage sensor can account for the full displacement of the gating charges across the electric field.

## Methods

**Deletion Mutants.** According to Wallner *et al.* (23) the S3–S4 linker is the protein domain comprised of between amino acid valine 330 and isoleucine 360. Based on this definition we constructed the deletion mutants listed below (Table 1). The mutants were named by the remaining amino acids in the S3–S4 linker as indicated in the second column of Table 1.

**Molecular Biology.** Constructs were prepared on n-type inactivation removed *Shaker*H4 $\Delta$ (6–46) (*Shaker* $\Delta$ ). The *Shaker* $\Delta$  K<sup>+</sup> channel cDNA was originally cloned into an engineered version of the pBSTA vector. The S3–S4 deletion mutants were prepared by PCR-based mutagenesis (Expand Hi Fidelity PCR System, Roche Molecular Biochemicals; or Pfu DNA polymerase, Stratagene). Primer design, purification of the PCR products, transformation of the DH5  $\alpha$  or XLI blue competent *Escherichia coli*

\*To whom reprint requests should be addressed. E-mail: ramon@cecs.cl.

**Table 1. Properties of S3–S4 linker deletion mutants**

| Mutant  | Amino acids remaining in deletion zone | $\tau_{act}$ (0)* (ms) | $\tau_{deact}$ (0) (ms) | $V_{1/2}^{\dagger}$ (mV) | $z\delta^{\ddagger}$ | $N$ |
|---|--|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Shaker $\Delta$                               | VVAEEEDTLNLPKAPV<br>SPQDKSSNQAMSLAI    | 3.2 ± 0.8              | 12.1 ± 1.3              | -52 ± 9                  | 1.9 ± 0.9            | 5   |
| C-terminal side of the deleted region         |  |                        |                         |                          |                      |     |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–360)               | None                                   | 141.0 ± 6.1            | 96.7 ± 11.7             | -28 ± 3                  | 0.9 ± 0.1            | 10  |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–359)               | I                                      | 535.1 ± 9.2            | —                       | -7 ± 1                   | 0.8 ± 0.1            | 6   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–358)               | AI                                     | 692.1 ± 107.0          | 22.7 ± 8.2              | -46 ± 11                 | 2.1 ± 0.9            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–357)               | LAI                                    | 5.7 ± 0.1              | 161.6 ± 15.4            | -41 ± 9                  | 1.6 ± 0.9            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–356)               | SLAI                                   | 89.1 ± 2.1             | 8.3 ± 1.1               | 7 ± 2                    | 1.7 ± 0.7            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–355)               | MSLAI                                  | 458.9 ± 9.8            | 80.9 ± 10.7             | -23 ± 5                  | 1.7 ± 1.0            | 7   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–354)               | AMSLAI                                 | 13.2 ± 1.9             | 29.5 ± 8.9              | -39 ± 9                  | 2.8 ± 1.0            | 10  |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–353)               | QAMSLAI                                | 6.4 ± 0.5              | 120.0 ± 48.4            | -25 ± 7                  | 2.8 ± 1.1            | 6   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–352)               | NQAMSLAI                               | 7.5 ± 2.5              | 42.0 ± 6.6              | -23 ± 7                  | 4.2 ± 1.1            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–350)               | SSNQAMSLAI                             | 4.5 ± 0.3              | 49.6 ± 6.9              | -46 ± 8                  | 2.3 ± 0.8            | 10  |
| N-terminal side of the deleted region         |  |                        |                         |                          |                      |     |
| Shaker $\Delta\Delta$ (331–360)               | V                                      | 23.8 ± 0.3             | 76.2 ± 7.8              | 38 ± 10                  | 2.9 ± 1.0            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332–360)               | VV                                     | 3.3 ± 0.2              | 13.1 ± 0.9              | -40 ± 8                  | 1.4 ± 0.9            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (333–360)               | VVA                                    | 22.9 ± 8.0             | 220.0 ± 66.3            | -77 ± 7                  | 3.4 ± 1.0            | 6   |
| Other deletion mutants                        |  |                        |                         |                          |                      |     |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332–357)               | VVLAI                                  | 44.1 ± 1.2             | —                       | 46 ± 7                   | 1.2 ± 0.2            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (330–355)<br>A359VI360V | MSLVV                                  | 1,484.0 ± 311.1        | —                       | -2 ± 1                   | 1.2 ± 0.2            | 5   |
| Shaker $\Delta\Delta$ (332–355)               | VVMSLAI                                | 13.4 ± 1.4             | —                       | -42 ± 5                  | 2.6 ± 0.5            | 5   |

Shaker $\Delta$  is the control channel ShakerH4 $\Delta$ (6–46).

\*The activation time constant at zero voltage was obtained by simple interpolation of the  $\tau_{act}$  vs. voltage data in those cases that measurements of  $\tau_{act}$  could be done for positive and negative voltages or by extrapolation of the data to 0 mV when the  $\tau_{act}$  data were only obtained for positive voltages (solid lines in Fig. 2A).

<sup>†</sup>Parameters calculated by fitting the voltage activation data to Eq. 5.  $N$  is the number of different cell-attached patches used to measure macroscopic currents induced by Shaker $\Delta$  and S3–S4 linker mutants.

cells, colony selection, DNA sequencing, subcloning, and transcription to cRNA were as in Gonzalez *et al.* (21).

**Electrophysiology.** *Xenopus* oocytes were injected with 50 nl of cRNA solution (0.1–0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Two to five days after cRNA injection, currents elicited by the different mutants were recorded in cell-attached macropatches of oocyte membrane. Patch pipettes of 10–30  $\mu\text{m}$  had a resistance of  $\approx 1\text{ M}\Omega$ . Bath and pipette solutions contained 110 mM potassium methanesulfonate, 10 mM Hepes, and 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.2. The acquisition and basic analysis of the data were performed with PCLAMP 6.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA) driving a 12-bit analogue interface card (LABMASTER DMA, Scientific Solutions, Solon, OH) and with our own software, ANALYSIS).

For macroscopic current analysis, pulse protocols used a holding potential of -100 mV, a test pulse between -90 and +180 mV in 3- to 10-mV increments, followed by a tail pulse at -60. The duration of the test pulse was modified according to the kinetic properties of individual mutants. Voltage-activation curves were calculated by using standard tail-current analysis (e.g., ref. 21). Activation kinetics were compared among various mutants by fitting the upper 50% of the rising phase of the current to an exponential function. The time course of channel activation was  $I(t) = 0$  for  $t < d$  and for  $t > d$  it was fitted to:

$$I(t) = I_{max}[1 - \exp(-(t - d)/\tau_{act})], \quad [1]$$

where  $d$  is the delay and  $\tau_{act}$  the time constant of the exponential. In a sequential model,  $1/\tau_{act}$  is a good estimate of the rate-limiting rate constant of the process (24). Deactivation kinetics parameters were obtained by fitting the early decay of the tail current to a sum of two exponential decays. The fastest time constant of the decay of the tail currents was used as an estimation of the rate constant for closing.

**Variance Analysis and Limiting Slope Analysis.** To estimate the maximum probability of opening we collected 256–1,024 current records during activation of the channels by a depolarizing voltage step. Ensemble average current ( $\langle I \rangle$ ) and its variance ( $\sigma^2$ ) on each isochrone was computed as described (25). The variance ( $\sigma^2$ ) as a function of the ensemble mean current ( $I$ ) data were fitted by the equation:

$$\sigma^2 = i\langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N}, \quad [2]$$

where  $i$  is the open channel unitary current and  $N$  the number of channels in the patch (25, 26). The maximum open probability  $P_0^{max}$  was obtained according to the relation:

$$P_0^{max} = \frac{I_{max}}{iN}, \quad [3]$$

where  $I_{max}$  is the maximum mean current measured in the experiment. The effective gating charge coupled to channel opening was obtained from the limiting slope analysis (27, 28). The ionic current recorded during a voltage ramp was subtracted off-line from the linear leakage and subsequently converted into conductance [ $g(V)$ ] by dividing the ionic current by its driving force. The value for the effective charges per channel ( $z_{lim}$ ) was obtained from the relationship

$$z = \frac{kT}{e_0} \frac{d}{dV} (g(V)/g_{max}), \quad [4]$$

where  $k$  is the Boltzmann constant,  $T$  the absolute temperature,  $g_{max}$  the maximum conductance, and  $e_0$  the charge of the electron. In the limit of large negative voltages,  $z$  will asymptotically approach

totically approach a constant value equal to the total number of charges per channel,  $z_{lim}$ .

**Evaluation of Periodicity.** For the sake of simplicity we assume that channel opening involves four independent and identical conformational changes of the subunits forming the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. In this model  $P_0^{rel}$  would be described by the fourth power of a Boltzmann distribution (31):

$$P_0^{rel} = \left[ \frac{1}{1 + \exp[-z\delta F(V - V_{1/2})/RT]} \right]^4, \quad [5]$$

where  $z\delta$  is the equivalent charge,  $V_{1/2}$  is the voltage where half of the independent and identical conformational changes have occurred, and  $F$  is Faraday's constant,  $R$  the universal gas constant and  $T$  the absolute temperature. The relative open probability can be rewritten as (31):  $P_0^{rel} = [1 + K_0 \exp(-z\delta V/RT)]^{-4}$  where  $K_0 = \exp(z\delta FV_{1/2}/RT)$  represents the voltage-dependent equilibrium constant in the absence of any applied voltage for the activation of each voltage sensor. The change in free energy caused by each deletion ( $\Delta\Delta G^0$ ) was calculated according to the relation:

$$\Delta\Delta G^0 = RT \ln \frac{K_{0,mutant}}{K_{0,Shaker}}, \quad [6]$$

where  $K_{0,mutant}$  and  $K_{0,Shaker}$  are the equilibrium constants for the mutants and the wild type, respectively.

The change in free energy of activation ( $\Delta\Delta G^*$ ) caused by the mutations was obtained from the relation

$$\Delta\Delta G^* = RT \ln \frac{\tau_{act,mutant}}{\tau_{act,Shaker}}, \quad [7]$$

where  $\tau_{act,mutant}$  and  $\tau_{act,Shaker}$  are the activation time constants determined at 0 mV for the deletion mutant and the *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channel, respectively.

Preliminary evaluation of the periodicity of the free energy changes as a function of the number of amino acid residues was done by fitting trigonometric functions of the form

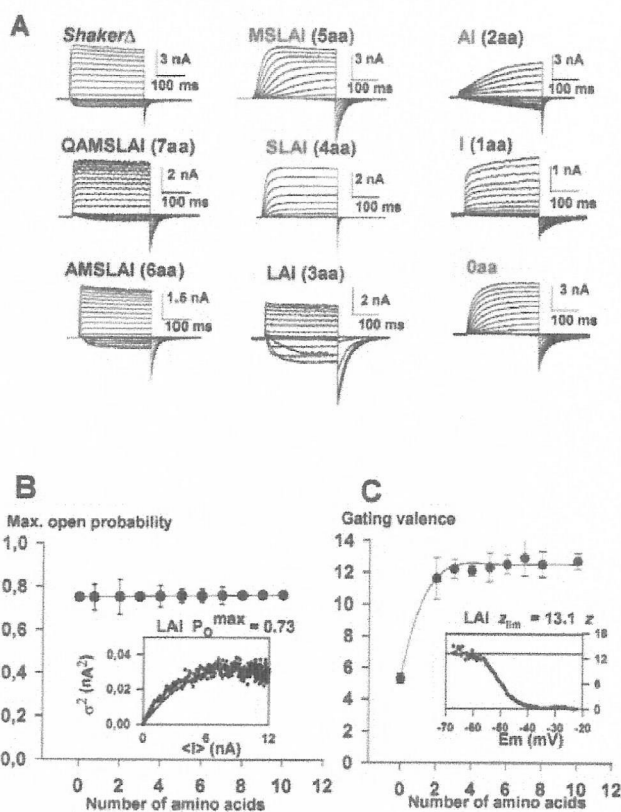
$$\Delta\Delta G = a + b \sin(\theta n + \varphi), \quad [8]$$

where  $n$  is the number of amino acids remaining in the deletion region,  $\theta$  is an angular frequency related to the number of amino acid residues in a period, and  $a$ ,  $b$ , and  $\varphi$  are constants. Best values of  $a$ ,  $b$ ,  $\theta$ , and  $\varphi$  were searched for by using a least-square curve-fitting procedure (SOLVER, Microsoft EXCEL).

Fourier transform methods (29, 37) were used to evaluate further the periodicity of the changes in Gibbs free energy between closed and open states as well as the changes in activation energy. The Fourier transform power spectrum of  $\Delta\Delta G^*$  or  $\Delta\Delta G^0$ ,  $P(\omega)$ , were calculated as described by Cornette *et al.* (29).  $P(\omega)$  as a function of angular frequency  $\omega$  was used to calculate the periodicity of the changes in free energy for the various mutations.

To evaluate the  $\alpha$ -helical character from power spectra, the  $\alpha$ -periodicity index ( $\alpha$ ) at 100° was calculated with:

$$\alpha = \frac{\frac{1}{30} \int_{90}^{120} P(\omega) d\omega}{\frac{1}{180} \int_0^{180} P(\omega) d\omega}. \quad [9]$$



**Fig. 1.** (A) Functional expression of deletion mutants in *Xenopus* oocytes. The holding potential was  $-100$  mV, and the membrane was pulsed to voltages between  $-100$  to  $+125$  mV in  $10$ -mV increments followed by a step to  $-60$  mV. (B) Variance analysis for the deletion mutants. The solid line represents the mean  $P_0^{max}$  among the different linker mutants. (Inset) The mean current induced by the LAI mutant was obtained from 256 current traces recorded with the patch technique from a holding voltage of  $-100$  mV to a test potential of  $120$  mV. Variance ( $\sigma^2$ ) versus mean current ( $\langle I \rangle$ ) was fitted to a parabola (solid line, Eq. 2) where the single channel amplitude,  $i$ , and the number of channels,  $N$ , was left as free parameters.  $P_0^{max}$  was obtained by using the relation  $I_{max}/iN$ . The maximum  $P_0$  was  $0.73$ . (C) Limiting slope analysis in S3-S4 linker mutant channels. The number of charges,  $z$ , as a function of voltage was obtained by using a voltage ramp and recording the ionic current. The speed of the ramp was such to ensure steady-state conditions ( $1.2$  mV/s), and the result was the same when ramping in the positive and the negative direction. The number of charges per channel was obtained by using Eq. 4 as illustrated in the Inset where  $z$  is plotted against applied voltage. The solid line indicates the asymptotic value of  $z$  at very hyperpolarizing voltages,  $z_{lim}$ . Blue, green, and red letters indicate fast, intermediate, and slow activation kinetics mutants, respectively.

An ideal  $\alpha$ -helix should give a peak in the power spectrum at  $\omega = 100$ .  $\alpha$  values  $>2$  have been considered indicative of  $\alpha$ -helical structure (29, 37).

## Results

**Deletions at the Carboxyl-Terminal End of the S3-S4 Linker.** In previous studies we showed that complete removal of the region comprised between amino acid residues 330 and 360 (0-aa mutant) dramatically slowed down the *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channel gating kinetics (21). In view of these results, we carried out a systematic study of a series of S3-S4 linker deletion mutant channels to define the minimal linker necessary to recover the gating characteristics of the control channel. Deletion mutants constructed yield strong K<sup>+</sup> currents when expressed in *Xenopus laevis* oocytes (Fig. 1A). The exception was the I mutant (Table 1), which expressed poorly and in many batches of oocytes we were unable to detect K<sup>+</sup> currents.



increasing the activation time constant with respect to the 0-aa mutant, has the effect of decreasing it. Adding a third amino acid (LAI mutant) restored the time constant value to that of the *Shaker* $\Delta$ . Linkers with 4 or 5 aa exhibited again activation time constants that are 28 and 143 times longer at 0 mV than the *Shaker* $\Delta$  activation time constant, respectively (Fig. 2A; Table 1). Mutants with S3-S4 linkers with 7, 8, or 10 aa have activation time constants similar to that obtained for *Shaker* $\Delta$  (Fig. 2A and B; Table 1).

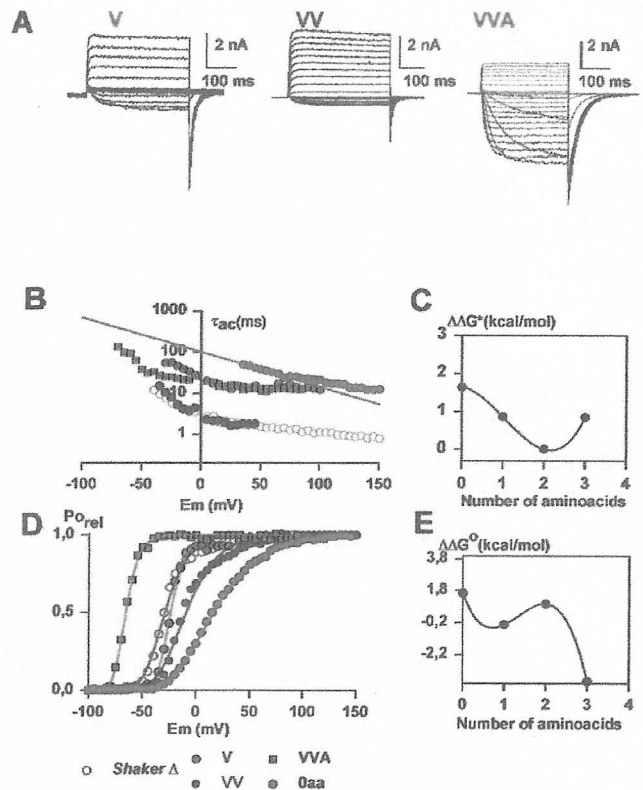
The change in free energy of activation ( $\Delta\Delta G^*$ ) due to the mutations was obtained from the activation time constants by using Eq. 7. The  $\Delta\Delta G^*$  data, if only linker mutants containing 0–6 aa are considered, is well described by a sine function (Eq. 8) with an angle  $\theta = 98^\circ$  (Fig. 2B). This angle implies a period of 3.7 aa residues per revolution (Fig. 2B). This periodicity in the variation of the activation rate constant is consistent with a model in which the amino acids of the linker adopt some form of helical secondary structure. The Fourier transform power spectrum using the  $\Delta\Delta G^*$  values computed from the activation time constants for the linker mutants between Gln-354 and Ile-360 is shown in Fig. 2C. The strongest peak occurs at  $100^\circ$ , a frequency within the characteristic range for a  $\alpha$ -helix (29). The  $\alpha$ -periodicity index (Eq. 9) calculated from the spectrum in Fig. 2C is 2.98.

**Deactivation Time Constants.** Although the deactivation time constants also are affected by the deletions performed in the S3-S4 linker, they did not show periodicity (Table 1) and will be not discussed further in this article.

**Effects on the Voltage Activation Induced by Deletions at the Carboxyl-Terminal End of the S3-S4 Linker.** Conductance versus voltage curves for the control and mutant channels were obtained directly by plotting the peak tail current amplitude at a constant postpulse potential ( $-60$  mV). Responses to families of depolarizing pulses are shown in Fig. 1A for the *Shaker* $\Delta$  and 7-, 6-, 5-, 4-, 3-, 2-, 1-, and 0-aa S3-S4 linker mutants. Fig. 2D shows that mutants with activation kinetics close to that of *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channel have voltage activation curves qualitatively similar (compare *Shaker* $\Delta$  and the 7-, 6-, and 3-aa linker mutants in Fig. 2D). However, the amount of shifting to the right in the voltage activation curves is not proportional to the linker length (Table 1) and shows periodicity (see Fig. 2E). Assuming that the movement of each subunit follows a simple two-state model in which they can be in either a resting or in a permissive state, the conductance-voltage data were fit by using a Boltzmann to the fourth power (Eq. 5 in Methods). The voltage-dependent equilibrium constant in the absence of any applied voltage for the activation of each voltage sensor was calculated from the  $V_{1/2}$  values obtained from fits to Eq. 5 by using the relationship  $K_0 = \exp(z\delta FV_{1/2}/RT)$ . The assumption of the two-state model is an oversimplification but convenient operationally to obtain the change in free energy due to the deletions,  $\Delta\Delta G^*$ , by using Eq. 6.

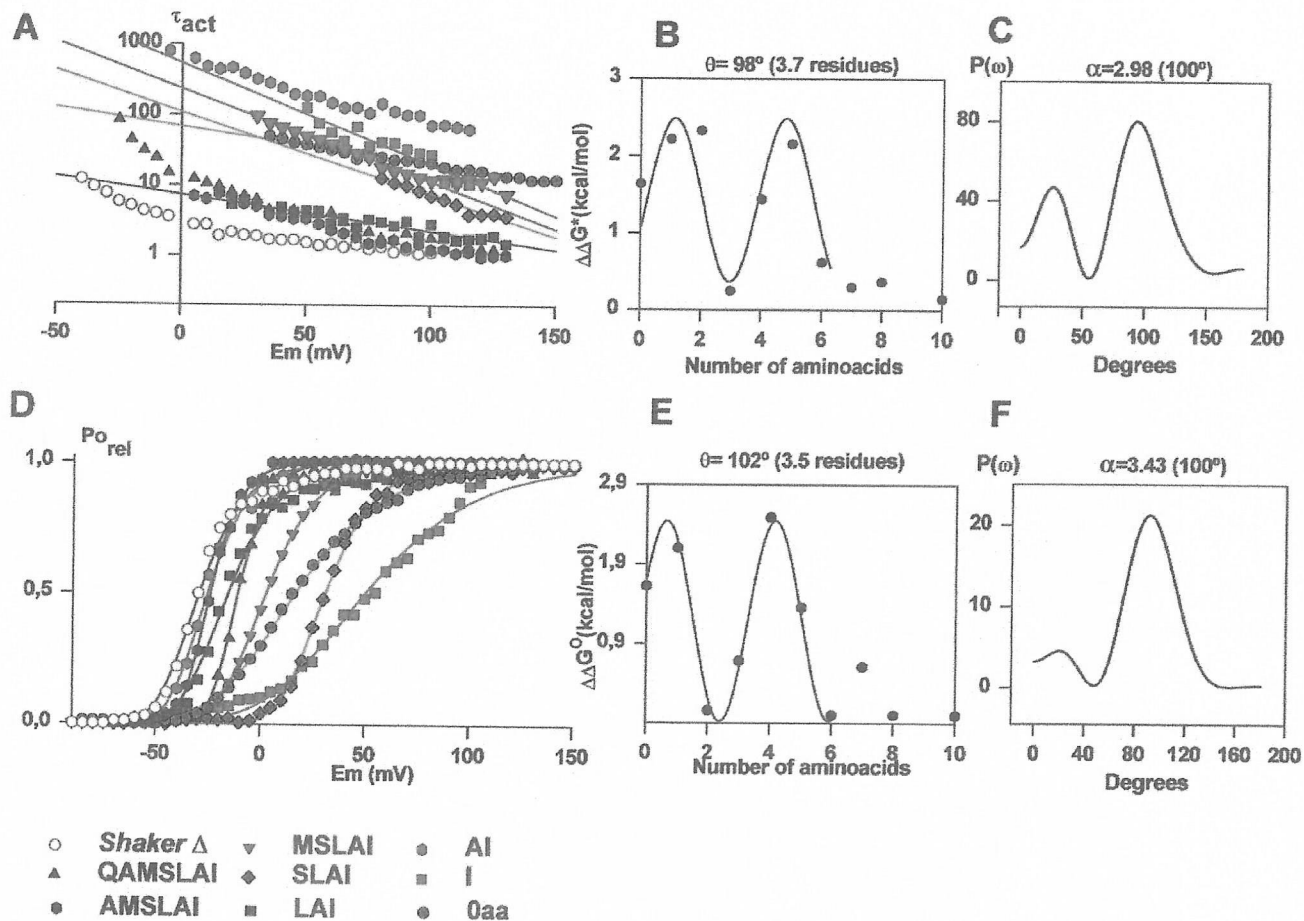
Comparison of the  $K_0$  values is meaningful because  $K_0$  determines the equilibrium between active and resting conformation of subunits in both cases. The  $\Delta\Delta G^*$  data are well fitted by using a sine function (Eq. 8) with  $\theta = 102^\circ$  (Fig. 2E). This angle implies a period of 3.5 aa residues, which is consistent with an  $\alpha$ -helical structure. The power spectrum [ $P(\omega)$ ] shown in Fig. 2F shows a strong peak at  $100^\circ$  and  $\alpha$  value of 3.43 (Eq. 9). This large  $\alpha$  value strongly suggests that the stretch of amino acid considered, Ala-355 to Leu-361, has a  $\alpha$ -helical structure.

**Deletions at the Amino-Terminal End of the S3-S4 Linker.** We examine now the effect of the linker length but this time by adding amino acids belonging to the N-terminal side of the linker. Ionic currents induced by the V, VV, and VVA mutants are shown in Fig. 3A. The three mutants studied have maximum probability of opening with an average value of 0.75. The number of gating



**Fig. 3.** (A) Functional expression of deletion mutants at the amino terminal end of the S3-S4 linker. The holding potential was  $-100$  mV and the membrane was pulsed to voltages between  $-70$  mV to  $125$  mV in  $10$ -mV increments followed by a step to  $-60$  mV for the V and VV mutants. For the holding voltage of VVA mutant was  $-100$  mV, and the membrane was pulsed between  $-100$  mV and  $125$  mV in  $10$ -mV increments followed by a step to  $-100$  mV. (B) Voltage dependence of the activation kinetics of the deletion mutants shown in A. Time constants were determined as described in Methods. V, green diamonds; VV, blue triangles; VVA, green squares. For comparison the results for 0 aa (red circles) and the *Shaker* $\Delta$  (blue circles) are shown. (C) Changes in activation free energy of the rate limiting step of channel opening at  $0$  mV ( $\Delta\Delta G^*$ ) induced by deletions in the S3-S4 linker region.  $\Delta\Delta G^*$  was calculated as described in Results. Activation time constant data were obtained from Table 1. (D) Voltage-activation curves in deletion mutants at the amino-terminal end of the S3-S4 Linker. Symbols as in A. Each point is the average of determinations on 5–10 separate patches. Solid lines were drawn by using the parameters in Table 1 and Eq. 5. (E) Distribution of free energy perturbations ( $\Delta\Delta G^*$ ) in channel activation. Changes in activation free energy  $\Delta\Delta G^*$  caused by each mutant were calculated from  $V_{1/2}$  and  $z\delta$  as described in Methods. For more details see legend of Fig. 2.

charges per channel was measured by using the limiting slope method only for the VV mutant channel, and it was 12.5. The V mutant channel proved to be 7.4-fold slower than the wild-type *Shaker* $\Delta$  channel, and its voltage-activation curve is right-shifted by  $14$  mV (Fig. 3B and D and Table 1). The voltage-activation curve for the VV mutant is right-shifted by  $7$  mV and its activation time constant at  $0$  mV ( $3.3$  ms) is almost identical to that of the *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channel (Fig. 3B and D and Table 1). The activation time constant at  $0$  mV for the VVA mutant is similar to that of the V mutant but its voltage-activation curve is left-shifted in  $40$  mV with respect to the *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channel (Fig. 3B and E and Table 1). The changes in activation time constant and  $V_{1/2}$  as those found on the N-terminal side of the linker exhibit a nonmonotonous behavior (Fig. 3C and E). However, given the scarce number of mutants studied it is not possible to determine the degree of periodicity of  $\tau_{act}$  or  $V_{1/2}$ .



**Fig. 2.** (A) Voltage dependence of the activation kinetics in *ShakerΔ* and deletions mutants at the carboxyl-terminal end of the S3–S4 linker. 0 aa, green circles; I, red squares; AI, red hexagon; LAI, blue squares; SLAI, green diamond; MSLAI, red inverted triangles; AMSLAI, blue hexagons; QAMSLAI, blue triangles; *ShakerΔ*, blue open circles. The solid lines are fits to the data by using an equation of the form  $\tau_{act} = A \exp(-ZFV/RT)$  where  $A$  is a constant and  $Z$  defines the voltage dependence of  $\tau_{act}$ . (B) Changes in activation free energy of the limiting rate of channel opening at 0 mV ( $\Delta\Delta G^*$ ) induced by deletions in the protein region between S3 and S4.  $\Delta\Delta G^*$  was calculated from Eq. 7. Activation time constant data for the *ShakerΔ* and deletion mutant channels are from Table 1. The data are fitted to Eq. 8 with  $\theta = 98^\circ$ . (C) The power spectrum of the  $\Delta\Delta G^*$  values considering up to the value of the 7-aa deletion mutant. The maximum  $\alpha$  periodicity index,  $\alpha$  value (2.98) was obtained at  $100^\circ$ . (D) Effects on the voltage activation induced by deletions at the carboxyl-terminal end of the S3–S4 linker. Symbols are as in A. Each point is the average of determinations on 5–10 separate patches. Solid lines were drawn by using the parameters in Table 1 and Eq. 5. (E) Distribution of free energy perturbations ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) in channel gating. Changes in activation free energy  $\Delta\Delta G^\circ$  caused by each mutant were calculated from  $V_{1/2}$  and  $z\delta$  as described in *Methods* (Eq. 6). The data are fitted by Eq. 8 with  $\theta = 102^\circ$ . (F) Power spectrum of the  $\Delta\Delta G^\circ$  values considering up to the value of the 7-aa deletion mutant. The maximum  $\alpha$  value of 3.43 was obtained at  $100^\circ$ .

**Number of Equivalent Gating Charges ( $z_{lim}$ ) per Channel and Maximum Open Probability ( $P_0^{max}$ ).** For all mutants tested, we determined the number of gating charges per channel,  $z_{lim}$  and maximum open probability,  $P_0^{max}$ . These two parameters help us to determine whether or not the deletions were affecting the charge displacement and/or the coupling of the voltage sensor movement to the pore opening (Fig. 1 B and C).  $P_0^{max}$  of the opening for the *ShakerΔ* K<sup>+</sup> and the linker mutant channels was determined by using nonstationary fluctuation analysis (25, 26, 30). As an example, in Fig. 1B *Inset* we show the variance-mean current plot obtained for the LAI mutant. The maximum open probability was obtained by using Eq. 3 and was 0.73. We found that  $P_0^{max}$  was, within experimental error, the same for the *ShakerΔ* K<sup>+</sup> and for all of the mutants channels studied here (Fig. 1B). The average maximum open probability was 0.75 (solid line, Fig. 1B).

To calculate the number of effective charges per channel ( $z_{lim}$ ), we applied the limiting slope method. In this case, the number of charges per channel is only obtained when the probability of opening approaches zero. For all mutants we determined the slope

of the logarithm of the conductance-voltage curve at low open probabilities and  $z$  at different voltages (see Eq. 4, *Methods*).  $z$  plotted as a function of voltage should reach a plateau that is equal to the actual value of the limiting slope,  $z_{lim}$  (see Fig. 1C *Inset*). Complete removal of the linker results in a channel with a gating valence reduced to one-half as measured by using the limiting slope method (21). For all other mutants studied the limiting slope is consistent with a gating charge of 12–13 electron charges, which is also the charge observed for the *ShakerΔ* (Fig. 1C).

**Activation Time Constants Are a Periodic Function of the Number of Amino Acids in the S3–S4 Linker.** Activation time constants ( $\tau_{act}$ ) measured as a function of voltage and the number of amino acids left on the C-terminal side of the linker are plotted on Fig. 2A. Our naive expectation was that the zero voltage activation time constant would decrease monotonically as amino acids are added to the linker, reaching a value close to the *ShakerΔ* when the linker is large enough. Experimental observation contradicted this expectation because the AI mutant (Table 1), instead of



Surprisingly, the gating kinetics of the VV mutant channel is more than 2 orders of magnitude faster than the 2-aa linker mutant AI. We do not have an explanation for this paradox, but apparently not only the number, but also the type of amino acids contained in the zone that put in contact the S3 and S4 segments determines the activation kinetics. This contention is supported by the fact that the mutant MSLAI is slow but the mutant VVLA1 has activation kinetics 10-fold faster and the mutant MSLVV is again very slow (Table 1).

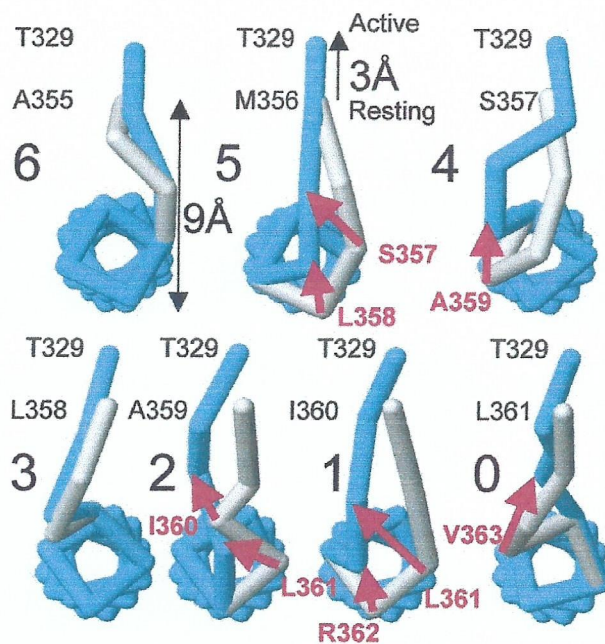
### Discussion

The general conclusion of this work is that the reduction of the linker does not prevent channel gating. In fact, the linker can be shortened drastically and the channel still opens with the same open probability, indicating that the conformational change of the S4 segment is still as complete as in the wild type. In the extreme case, when the linker is reduced to 0 aa, the kinetics of opening are slowed down but the open probability is still normal. In this mutant the total gating charge is reduced, suggesting that at least one of the charges are not moving in the electric field. The model developed below predicts this effect. The kinetics are normal when the linker contains two valines. This means that a channel with a very short linker is still gating normally, implying that, unless S3 moves along with S4, the movement of the S4 is relatively small. Certainly the movement of 15 Å as implied by models that require an extrusion of the S4 to expose the first four charged residues (6, 18, 19) now seem highly unlikely.

There are other important consequences of the results. First, from the C terminus of the linker region, the channel protein accommodates deletions with a periodicity reminiscent of an  $\alpha$ -helical structure. This periodicity also reveals that a linker containing only 3 aa (LAI) is enough to have an activation gating kinetics and a displacement of the voltage sensor similar to the *Shaker* $\Delta$  K<sup>+</sup> channel. Second, when the length of the restored region is 5 aa residues or less, the kinetics of activation gating and the voltage dependence of the channels are determined by the length and the type of amino acid comprising the region. Two striking cases are the pair of mutants MSLAI and VVLA1 and the pair AI and VV. In both cases the mutant channels containing VV have fast activation kinetics (Table 1) whereas the mutants MSLAI and AI showed very slow activation. The position of the amino acids VV is also important because the mutant MSLVV is as slow as the MSLAI mutant. Third, introducing segments longer than 6 aa in the deletion zone between S3 and S4 induced channels with activation kinetics very similar to that of the unmodified channel. These results are most economically explained by assuming that in *Shaker* K<sup>+</sup> channels S4 is an  $\alpha$ -helix with the NH<sub>2</sub>-terminal edge extending at least up to alanine 355.

**S3–S4 Linker Definition.** There is no consensus about the extent of the S3–S4 linker. According to Wallner *et al.* (23) the S3–S4 linker is the protein domain comprised between amino acids Val-330 and Ile-360. However, Shih and Goldin (32) defined the S3–S4 loop as extending from at least Glu-333 to Met-356, but pointed out that the loop can extend further, because insertion of a Flag epitope after residue Val-363 does not disrupt channel function. Others have proposed the start of the linker in Gln-333 and the end in Ser-357 (33–35). According to this definition, elimination of the whole linker should not affect the activation kinetics much because it has amino acids residues VVASLA1 in the deletion zone (Table 1). Moreover, both tryptophan substitution and alanine substitution in the S3 transmembrane domain fails to produce an orderly pattern of functional segregation, making it difficult to define the NH<sub>2</sub> terminal of this region of the protein (refs. 36 and 37, but see ref. 38).

Based on our observations we propose that the S3–S4 linker definition (23), starting at Val-330 and ending at Ile 360, includes some amino acids of the N terminus of S4. An S3–S4 linker



**Fig. 4.** A molecular model that reproduces the observed periodicity of the activation time constant and half activation voltages as a function of the number of amino acids in the C-terminus side of the S3–S4 linker. The figure represents a top view from the extracellular side of a trace connecting the  $\alpha$  carbons of segment S4 and the S3–S4 linker for seven different deletion mutants, in both resting (gray) and activated (blue) states. Molecular models were created under Swiss-PDB viewer, released by Glaxo Wellcome Experimental Research in Geneva ([www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html](http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html)). Energy minimizations were done by using the GROMOS96 force field implementation of Swiss-PDB viewer. Structure renditions were prepared under WEBLAB VIEWERPRO released by Molecular Simulations, San Diego ([www.msi.com](http://www.msi.com)). Energy minimizations were done by using a S4  $\alpha$ -helical model including the side chains of the amino acids.

consistent with our results starts at Glu-333 and ends at Ala-355 although the  $\alpha$ -helical nature of the S4 region can be extended further into the S3–S4 linker (6). This result is of importance because although the alanine-substitution mutagenesis indicates that the C-terminal part of S4 is  $\alpha$ -helical (37), the structure of the N terminus is uncertain. The periodicity in the activation time constants found with the deletion procedure is difficult to explain without assuming that the N terminus of S4 is  $\alpha$ -helical in nature. It is of interest to note here that the proposal that the S4 domain undergoes a rotation during channel activation emerged from the observation that the site Ser-351, Ser-352, and Asn-353 move further from the pore, does not move, and moves closer to the pore, respectively (5). For this to happen these amino acid residues should be in an  $\alpha$ -helical conformation. Our results are consistent with an S4  $\alpha$ -helix extending at least up to residue Ala-355. However, it is perfectly possible that Ser-351, Ser-352, and Asn-353 are also part of the S4 and that beyond Ala-355 the  $\alpha$ -helix gets too slack to follow periodic changes in activation time constants or in the voltage-activation curves.

**A Structural Model Describes the Periodical Distribution of Activation Time Constants.** An illustration of a possible mechanism able to explain the observed periodicity of the activation time constants and  $V_{1/2}$  observed when we add amino acids to the C terminus of the linker is given in Fig. 4. We assume that the S4 segment has an  $\alpha$ -helical secondary structure (37). Fig. 4 shows the positions of the  $\alpha$ -carbons linked by sticks and the coordinates were calculated by assuming  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angles of typical



$\alpha$ -helix structure. The  $\alpha$ -carbon of the last amino acid of S3 was located 9 Å away from the first amino acid of the S4 helix on the resting configuration of the voltage sensor (Fig. 4). A view of the S4 segment from the extracellular side is shown. Threonine 329, which appears on the top of each drawing, is the last residue of segment S3. The residue next to Thr-329 down in the primary structure is the first residue of the S3–S4 linker and it is labeled on each drawing e.g., Ala-355 for the six-residue deletion mutant. The voltage sensor activation was simulated by a 3-Å displacement of S3 away from S4. The rationale of this maneuver is that S4  $\alpha$ -helix rotates during channel activation (5, 7), and this displacement may be seen as a particular way of moving S4 away from S3. The 3-Å displacement was taken considering that when the channel moves into the open state there is a voltage-dependent movement of  $\approx 3.2$  Å between residues on contiguous subunits (5). The structure in the activated state is painted in blue, and in the resting state in gray. Transition from the resting to the activated state for the six residues and the three-residue deletion mutants is accomplished by changing the dihedral angles of the residues forming the linker. For other mutants activation involves the dissociation of one or two residues from the S4  $\alpha$ -helix. Those residues that get dissociated upon activation are labeled in red and a red arrow indicates their displacements. The model predicts a fast activation for the mutants with six- or three-residue deletion mutants. For the other mutants, the model predicts slower activation because some extra activation energy is needed to break the hydrogen bonds holding the amino acid residues in the  $\alpha$ -helix structure. According to this model two hydrogen bonds are broken when five-, two-, and one-residue deletion mutants activate. Only one hydrogen bond breaks on the four- and zero-residue mutants. The number of hydrogen bonds compares well with the extra activation energy measured experimentally and listed in Table 1. The energy necessary to break a hydrogen bond in proteins is of the order of 1–2 kcal/mol. To compare the model predictions with our experimental data, we assume that  $\Delta\Delta G^*$  represents the energy necessary to break the hydrogen bonds in the  $\alpha$ -helix. In reasonable agreement with the model, we concluded that the process of activation should involve the breakdown of about two hydrogen bonds for the MSLAI, AI, and I mutants, 1.3 hydrogen bonds for the SLAI, and 1.5 hydrogen bonds for the 0-aa mutant.

The model we have developed provides a simple explanation to the decrease in the number of gating charges in the 0 linker mutant. In this case the charge residue R362 does not form part

of S4. This charged amino acid is left in the external milieu when the whole linker is deleted and it will not contribute to the gating charge displacement. It is clear, therefore, that a very short linker still allows for the displacement of all of the gating charges albeit in some cases with very slow kinetics (e.g., AI mutant).

**The Riddle of the N Terminus.** We have found that the kinetic properties of the deletion mutants with S3–S4 linkers containing 1, 2, or 3 aa of the N terminus, are dramatically different from the characteristics of the mutants with the same number of amino acids belonging to the C-terminus side of the S3–S4 linker. The molecular explanation constructed to explain the periodicity just does not work for these deletion mutants. Although the alanine and tryptophan scanning mutagenesis show an  $\alpha$ -helical pattern up to Pro-322 of the S3 segment, the secondary structure of the last 8 aa, from I325 to A332, departs from helical periodicity (36). However, more recently the  $\alpha$ -helical nature of the C terminus of the S3 domain was determined by monitoring the effects on channel gating and hanatoxin binding of lysine substitution in the *drk1* K<sup>+</sup> channel. This region of the S3 domain in the *drk1* K<sup>+</sup> channel interfaces with water and protein (38). In the lack of hard structural data it is difficult at present to emit an explanation for the results presented here. We can only say that there is something specific in the VV sequence of the N terminus of S3, because other amino acid pairs (e.g., AI) cannot replace it. One possible explanation for these results is that deletion mutants containing amino acids V, VV, and VVA as part of the S3–S4 linker disrupt the C terminus of the S3  $\alpha$ -helix to originate a linker long enough to allow normal kinetics for the movement of the S4.

In conclusion, the results presented here support the notion that the conformational change of the S4 segment upon voltage activation is small, perhaps of the order of 4 Å. This implies that to translocate all first four charges from the internal to the external medium upon depolarization, the S4 segment may rotate or change its tilt with minimal translation.

The excellent technical assistance of Miss Luisa Soto is acknowledged. We thank Mr. P. Rojas for help with the manuscript. This work was supported by Chilean grants Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica 100-0890 (R.L.) and Cátedra Presidencial, a Human Frontier in Science Program grant (R.L.), a group of Chilean companies (Compania del Cobre, Dimacofi, Empresas CMPC, MASISA, Telefónica del Sur (R.L.), and National Institutes of Health Grant GM30376 (F.B.). The Centro de Estudios Científicos is a Millennium Institute.

- Catterall, W. A. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 607–615.
- Baker, O. S., Larsson, H. P., Mannuzzu, L. M. & Isacoff, E. Y. (1998) *Neuron* **20**, 1283–1294.
- Cha, A. & Bezanilla, F. (1997) *Neuron* **19**, 1127–1140.
- Cha, A. & Bezanilla, F. (1999) *J. Gen. Physiol.* **112**, 391–408.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R. & Bezanilla, F. (1999) *Nature (London)* **402**, 809–813.
- Gandhi, C. S., Loots, E. & Isacoff, E. Y. (2000) *Neuron* **27**, 585–595.
- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S. & Isacoff, E. Y. (1999) *Nature (London)* **402**, 813–817.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S. & Isacoff, E. Y. (1996) *Neuron* **16**, 387–397.
- Loots, E. & Isacoff, E. Y. (2000) *J. Gen. Physiol.* **116**, 623–635.
- Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M. & Isacoff, E. Y. (1996) *Science* **271**, 213–216.
- Starace, D. M. & Bezanilla, F. (2001) *J. Gen. Physiol.* **117**, 469–490.
- Starace, D. M., Stefani, E. & Bezanilla, F. (1997) *Neuron* **19**, 1319–1327.
- Yang, N., Jr., George, A. L. & Horn, R. (1996) *Neuron* **16**, 113–122.
- Yang, N. & Horn, R. (1995) *Neuron* **15**, 213–218.
- Yusaf, S., Wray, P. D. & Sivaprasadarao, A. (1997) *Pflügers Arch.* **433**, 91–97.
- Bezanilla, F. (2000) *Physiol. Rev.* **80**, 555–592.
- Horn, R. (2000) *Biochemistry* **39**, 15653–15658.
- Catterall, W. A. (1986) *Trends Neurosci.* **9**, 7–10.
- Guy, H. R. & Seetharamulu, P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 508–512.
- Elinder, F., Arhem, P. & Larsson, H. P. (2001) *Biophys. J.* **80**, 1802–1809.
- Gonzalez, C., Rosenman, E., Bezanilla, F., Alvarez, O. & Latorre, R. (2000) *J. Gen. Physiol.* **115**, 193–207.
- Sorensen, J. B., Cha, A., Latorre, R., Rosenman, E. & Bezanilla, F. (2000) *J. Gen. Physiol.* **115**, 209–221.
- Wallner, M., Meera, P. & Toro, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14922–14927.
- Schoppa, N. E. & Sigworth, F. J. (1998) *J. Gen. Physiol.* **111**, 271–294.
- Sigworth, F. (1980) *J. Physiol. (London)* **307**, 97–129.
- Sigg, D., Stefani, E. & Bezanilla, F. (1994) *Science* **264**, 578–582.
- Almers, W. (1978) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **82**, 96–190.
- Sigg, D. & Bezanilla, F. (1997) *J. Gen. Physiol.* **109**, 27–39.
- Cornette, J. L., Cease, K. B., Margalit, H., Spuge, J. L., Berzofsky, J. A. & DeLisi, C. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 659–685.
- Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A. & Sigworth, F. J. (1992) *Science* **255**, 1712–1715.
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., Dittman, J. & Aldrich, R. W. (1994) *J. Gen. Physiol.* **103**, 279–319.
- Shih, T. M. & Goldin, A. L. (1997) *J. Cell Biol.* **136**, 1037–1045.
- Kamb, A., Tseng-Crank, J. & Tanouye, M. A. (1988) *Neuron* **1**, 421–430.
- Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1988) *Nature (London)* **331**, 137–141.
- Mathur, R., Zheng, J., Yan, Y. & Sigworth, F. J. (1997) *J. Gen. Physiol.* **109**, 191–199.
- Hong, K. H. & Miller, C. (2000) *J. Gen. Physiol.* **115**, 51–58.
- Li-Smerin, Y., Hackos, D. H. & Swartz, K. J. (2000) *J. Gen. Physiol.* **115**, 33–49.
- Li-Smerin, Y. & Swartz, K. J. (2001) *J. Gen. Physiol.* **117**, 205–217.

## HELICAL NATURE OF THE VOLTAGE SENSOR

Oswaldo Álvarez<sup>\*1</sup>, Eduardo Rosenmann<sup>2</sup>, Francisco Bezanilla<sup>2,3</sup>, Carlos González<sup>2</sup> and Ramón Latorre<sup>1,2,3</sup>

### 1. INTRODUCTION

I (Oswaldo Álvarez) was invited to give a talk during the symposium “Epithelia, Pumps, Transporters and Ion Channels: Structure and Function at 60” organized by CECS, Valdivia, to celebrate the 60th birthday of Ramón and Enrico. I was very happy to prepare a presentation about my collaboration with Ramón during the last years gathering material from our papers and lectures (e.g., González et al. 2000; González et al 2001). During a great barbecue party held in the countryside the participants of the symposium agreed to contribute to a book with the Meeting Proceedings and during that banquet this chapter was conceived. What follows is a rearrangement of the material following the history of developments from my point of view.

My participation on this project began when I was invited to join the weekly seminars of Ramón’s laboratory while he was still at the Facultad de Ciencias, Universidad de Chile in Santiago. At that time Carlos González was freshly arrived from Cuba and he was assigned a project involving deletions of the S3-S4 linker segment of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. The rationale of the project was based on the emerging evidence of the involvement of the S4 transmembrane segment as a voltage sensor. At that time the current hypothesis was that the S4 segment would move normal to the membrane surface when the membrane was depolarized (Catterall, 1986; Guy & Seetharamulu, 1986). In particular, Catterall based in the pioneering ideas of Armstrong (1981) proposed that the

---

\* Corresponding author.

<sup>1</sup> Universidad de Chile Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Casilla 653 Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Centro de Estudios Científicos, Arturo Prat 514, Valdivia, Chile.

<sup>3</sup> UCLA School of Medicine, Los Angeles, California, USA.

S4 helix displacement consisted in a rotation and a movement normal to the membrane plane (sliding helix model). This idea was a direct consequence of the primary structure of the S4 segment that has repetitions of the sequence arginine-X-X-arginine where X is a hydrophobic amino acid. The detailed studies performed with the *Shaker* K<sup>+</sup> channel (Aggarwal and MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996) revealed that four of the positive charges contained in S4 were important in determining the total number of gating charges per channel involved in activation. More recently, histidine-scanning mutagenesis, a methodology in which one by one the arginines contained in the S4 are replaced by histidines, demonstrated that these four charges move the entire electric field upon channel opening (Starace and Bezanilla, 2001)<sup>4</sup>. This is

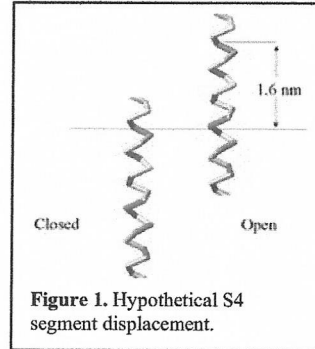


Figure 1. Hypothetical S4 segment displacement.

illustrated on figure 1 where the lipid bilayer is represented by the horizontal line. If the model shown in figure 1 was the correct one, then deleting the S3-S4 segment would

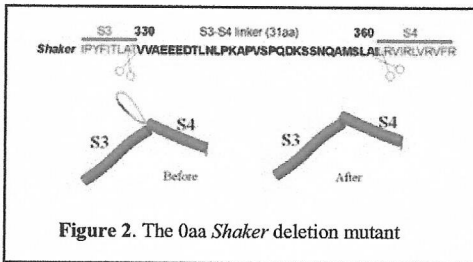


Figure 2. The Oaa *Shaker* deletion mutant

have a dramatic impact on the ability of S4 to move which could be revealed as large modifications of the position of the activation curve along the voltage axis and profound alterations of the kinetics of channel opening. In our laboratory Eduardo Rosemann was brave enough to suggest the construction of a mutant lacking the whole S3-S4 linker and this is how the short linker project started

(more details of this fascinating story can be found in Bezanilla, 2000; Yellen, 1998; Horn, 2000).

## 2. SHAKER CHANNEL WORKS WITH S3-S4 SEGMENT DELETED.

Our molecular biology laboratory produced the RNA of a short linker *Shaker* K<sup>+</sup> channel with the S3-S4 linker deleted and S3 and S4 segments connected directly (Fig. 2). The RNA was injected into oocytes and the cell-attached patch clamp determinations revealed the expression of *Shaker*-like currents. The currents were clearly voltage dependent, however the activation curve was displaced 45 mV to the right, the activation time constant was nearly 50 times longer, and the limiting slope charge was one half that of the wild type. Representative families of currents elicited by

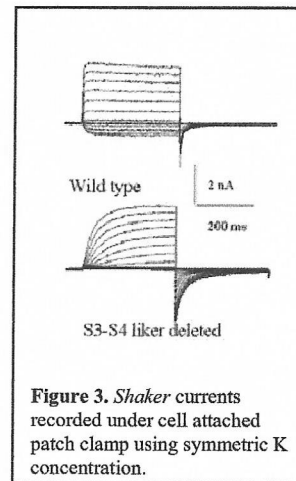


Figure 3. *Shaker* currents recorded under cell attached patch clamp using symmetric K concentration.

<sup>4</sup> In a pH gradient some of these histidines were able to grab a proton from the low pH side producing a measurable proton transport!

depolarizations under symmetric  $K^+$  concentrations are shown in figure 3. This observation was the starting point of a series of deletion mutants in which the amino acid residues were restored systematically to find what was the minimum length of the linker that would recover the characteristics of the wild type. The interpretation of the intriguing electrophysiology of these mutants originates long discussions that had may mind in turmoil for sometime and here I show the history of its development.

### 3. RESTORING THE S3-S4 LINKER GIVE CONFUSING RESULTS.

Figure 2 shows where the scissors severed the S3-S4 linker. At that time the S3-S4 linker segment was proposed to be the 31-amino acid residue stretch running from valine

330 to isoleucine 360. ( Wallner et al 1996) The mutant with the complete deletion of the so defined linker was called Oaa for zero amino acid. The mutants where some of the amino acid residues were restored were named after the one-letter code of

| Table I. Deletion Mutants. |            |                   | Name       | N  |
|----------------------------|------------|-------------------|------------|----|
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-360)$ | Oaa        | 0  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-358)$ | AI         | 2  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-357)$ | LAI        | 3  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-356)$ | SLAI       | 4  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-355)$ | MSLAI      | 5  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-354)$ | AMSLAI     | 6  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-353)$ | QAMSLAI    | 7  |
| <i>Shaker</i>              | H4A (6-46) | $\Delta(330-350)$ | SSNQAMSLAI | 10 |

the amino acids as seen on Table I. Later we found more convenient to name the mutants after the number of amino acid restored, as also seen of Table I.

For all the mutants described we measured: the conductance as a function of voltage using tail current analysis; activation time constant at large depolarizations; gating charge using the limiting slope method (Almers, 1978); and the maximum probability of finding the channel open using mean-variance analysis. The results, where:

- All channel mutants open to a maximum probability of 0.75 which is comparable to that of the wild type.
- Gating charge was  $6e^-$  for the Oaa mutant but close to  $13e^-$  for all others as well as for the wild type.
- Activation time constants were voltage-dependent. A plot of the 0 mV activation time constant gave a scattered plot as seen in figure 4.
- Conductance vs. potential curves were all displaced to the right with respect to the wild type. A plot of the half activation voltage gave a scattered plot similar to the drawn for the activation time constant.

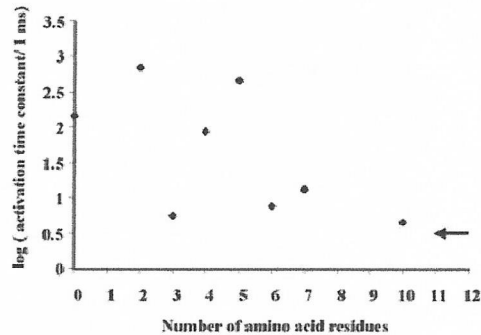
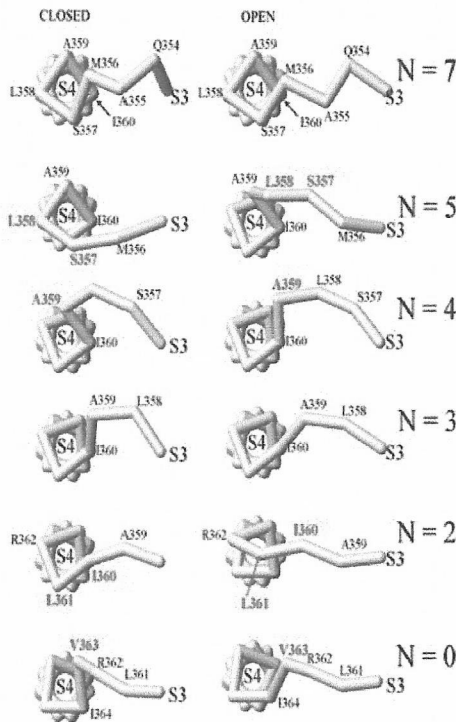


Figure 4. Plot of log of the activation time constant as a function of the number of residues restored. Arrow marks the wild type time constant.

#### 4. UNDERSTANDING THESE RESULTS.

The results for the activation time constant and the half activation voltage were unexpected. We expected a smooth transition from the Oaa to the wild type characteristics. The first step to understand the experiments was to make a mechanical model able to reproduce these results and allowing us to find some clues about the underlying molecular structure of the S4 domain. The mechanical model is restricted to the motion of S4 with respect to S3 since we expected this movement to be hindered by a short S3-S4 linker. In this model the motion of S4 with respect to S3 was set to be only 3 Å. For long S3-S4 linkers, the motion of S4 with respect to S3 can take place by



**Figure 5.** Mechanical model of voltage sensor. Closed to open transition is represented as a 3 Å displacement of S4 with respect to S3. Amino acids dissociated from the helix during the transition are labeled in red.

changing the dihedral angles of the backbone of the linker as shown for  $N = 7$  in figure 5. This involves a small amount of energy and therefore a fast activation rate constant. For  $N = 5$  the motion is no longer possible by changing the dihedral angles. In this case two amino acid residues have to dissociate from the S4 alpha helical structure. The residues dissociated are leu358 and ser357, labeled in bold face red characters. This takes a larger amount of energy and therefore a slow activation constant is expected. For  $N = 4$  some amino acid residues are already dissociated in the closed state. For the closed to open transition only one extra residue have to dissociate from the S4 alpha helix. The extra energy for this mutant is less than that for  $N = 5$  and therefore the activation constant is predicted to be faster than  $N = 5$  mutant but slower than  $N = 7$  mutant. For  $N = 3$  there are enough amino acids dissociated from the alpha helix that the motion can be done without further dissociation. According to the model the activation would be as fast as the  $N = 7$  mutant. For  $N = 2$  again two amino acid residues have to dissociate to allow the S4 motion and the activation is expected

to be as slow as it is for  $N = 5$ . Finally for  $N = 0$  only one amino acid has to dissociate and the activation rate constant must be comparable to that of  $N = 3$  mutant. The model reproduces the periodic behavior for the activation constant observed experimentally and shown in figure 4. In addition, the model explain the smaller gating valence found for  $N = 0$ , since arginine 362 is placed on the S3-S4 linker for this mutant.



The mechanical model was a useful guide to introduce the idea of partial dissociation of the S4 alpha helical structure. However it calls for too many *ad hoc* assumptions to reproduce the experimental results to be convincing. The next step was to make a simple curve fitting exercise. We calculated the free energy of activation,  $\Delta G^*$ , and the free energy of the closed to open transition,  $\Delta G_0$ . We compared the energies of the mutants with that of the wild type and searched for the best cosine function describing the two data sets,  $\Delta\Delta G^*$  and  $\Delta\Delta G_0$  as a function of N, the number of amino acids restored on the 0aa mutant. We were pleased to find out that cosine functions with an angular period of 3.6 amino acid residues per revolution described well our results. This was a nice independent analysis telling us that dissociation of amino acids from an alpha helix was involved in the activation of the short S3-S4 linker mutants.

We presented the mechanical model and the cosine curve fitting during a symposium held at CECS in Valdivia in the year 2000 and during the discussion period it was pointed out that the significance of the curve fitting was weak because of the small number of data points and the large number of adjustable parameters involved. It was also suggested to use a Fourier power spectrum analysis to evaluate the periodicity. Stimulated by this discussion we returned to the laboratory to fill the gaps to make a complete series of mutants from one containing no amino acids to a mutant having 10 amino acid residues in the S3-S4 linker (N = 0 to N = 10). We were pleased to find  $\Delta\Delta G^*$  and  $\Delta\Delta G_0$  data for N = 1 to N = 6 were, as expected, well described by a sine function. Moreover, as predicted by the mechanical model of Fig. 5, mutants with 8 and 9 amino acids in the linker showed fast kinetics. We computed the Fourier power spectrum finding a nice peak at 100 degrees, a result clearly consistent with the proposed  $\alpha$  helical nature of the amino terminus of the S4 segment ( $360^\circ/3.6$  residues per turn). We also evaluated the Alpha Periodicity Index,  $\alpha$ PI, (Cornette et al 1987) and found values of 3.0 and 3.4 for  $\Delta\Delta G^*$  and  $\Delta\Delta G_0$  respectively. Since values larger than 2.0 are considered good indications of alpha helical structures the mechanical model was on solid grounds. However, it can be argue that the number of data points included in the analysis is too small and a more robust test was needed to determine whether or not the amino acid segment we analyzed was a  $\alpha$  helix. As suggested by Dr. Richard Horn, we tested what is the probability of finding such  $\alpha$ PI values just by chance. To do so, we scrambled the experimental results and computed the  $\alpha$ PI for 1000 random permutations of the data. We observed that the probability of finding by chance the experimentally observed  $\alpha$ PI values is 0.06 for the activation energy and 0.03 for the equilibrium constant. The arrow in figure 6 shows the probability of finding by chance the experimental  $\alpha$ PI of  $\Delta\Delta G_0$ . These results indicate that the periodicity we found is true with a margin of error of 3 to 6%.

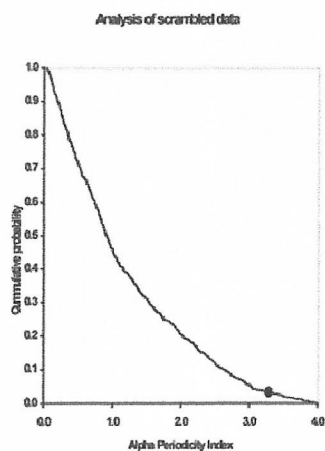


Figure 6. The vertical axis is the probability of finding by chance an  $\alpha$ PI better than the corresponding value of horizontal axis.



## 5. CONCLUSIONS.

We developed a deletion methodology to determine the structural nature of the N-terminus of the S4 determining that the S4  $\alpha$  helix extends up to amino acid residue methionine 355. In other words we added four amino acids to the N terminus of S4: the sequence MSLAI. More important, the present results are utterly inconsistent with structural models proposing large displacements of the S4 segment during channel activation. Actually, the four charges of the S4 that move from the cytoplasmic side of the channel to the external solution can be account for by a movement of the voltage sensor with respect to S3 as small as 3 Å.

## 6. REFERENCES

- Aggarwal, S. K., and MacKinnon R., 1996, Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel, *Neuron*, **16**:1169-1177.
- Almers, W., 1978, Gating currents and charge movements in excitatory membranes, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **82**:96-190.
- Bezanilla, F., 2000, The voltage sensor in voltage-dependent ion channels, *Physiological Reviews*, **80**:555-592.
- Catterall, W., A., 1986, Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels, *Annual Review of Biochemistry*, **55**:953-985.
- Cornette, J. L., Cease, K. B., Margalit, H., Spouge, J.L., Berzofsky, J.A., and DeLisi, C., 1987, Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *Journal of Molecular Biology*, **95**:659-685.
- Gonzalez, C., Rosenmann, E., Bezanilla, F., Alvarez, O., and Latorre, R., 2000, Modulation of the Shaker channel gating by the S3-S4, *Journal of General Physiology*. **115**:193-207.
- Gonzalez, C., Rosenmann, E., Bezanilla, F., Alvarez, O., and Latorre, R., 2001, Periodic perturbations in Shaker channel kinetics by deletions in the S3-S4 linker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 9617-9623.
- Guy, H. R., Seetharamulu, P., 1986, Molecular model of the action potential sodium channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **508**:508-512.
- Horn, R., 2000, Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry*, **39**:15653-15658.
- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., and Bezanilla, F., 1996, Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K channel, *Neuron*, **16**:1159-1167.
- Wallner, M., Meera, P., and Toro, L., 1996, Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in high conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: An additional transmembrane region at the N-terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**:14992-14927.
- Yellen, G., 1998, The moving parts of voltage-gated ion channels, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **31**:239-295.

## COUNTING CHANNELS: A TUTORIAL GUIDE ON ION CHANNEL FLUCTUATION ANALYSIS

Oswaldo Alvarez,<sup>1,2</sup> Carlos Gonzalez,<sup>1</sup> and Ramon Latorre<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Científicos, Valdivia; and <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago 6850240 Chile

**I**on channels open and close in a stochastic fashion, following the laws of probability. However, distinct from tossing a coin or a die, the probability of finding the channel closed or open is not a fixed number but can be modified (i.e., we can cheat) by some external stimulus, such as the voltage. Single-channel records can be obtained using the appropriate electrophysiological technique (e.g., patch clamp), and from these records the open probability and the channel conductance can be calculated. Gathering these parameters from a membrane containing many channels is not straightforward, as the macroscopic current  $I = iNP_o$ , where  $i$  is the single-channel current,  $N$  the number of channels, and  $P_o$  the probability of finding the channel open, cannot be split into its individual components. In this tutorial, using the probabilistic nature of ion channels, we discuss in detail how  $i$ ,  $N$ , and  $P_{o,max}$  (the maximum open probability) can be obtained using fluctuation (nonstationary noise) analysis (Sigworth FJ. *G Gen Physiol* 307: 97-129, 1980). We also analyze the sources of possible artifacts in the determination of  $i$  and  $N$ , such as channel rundown, inadequate filtering, and limited resolution of digital data acquisition by use of a simulation computer program (available at [www.cecs.cl](http://www.cecs.cl)).

ADV PHYSIOL EDUC 26: 327-341, 2002;  
10.1152/advan.00006.2002.

*Key words:* noise; variance analysis; rundown; filter; single channel

Ion channels are molecular machines, perfectly tuned to the transport of ions through the cell membrane, with very high efficiency ( $10^6$ - $10^8$  ions/s) [Latorre and Miller (13), Hille (11)]. Ion channels belong to a class of integral membrane proteins, some of which have evolved as highly selective to a given ion. For example, some potassium channels are  $\sim 1,000$  times more permeable to  $K^+$  than to  $Na^+$ . Amazingly, despite their exquisite ion selectivity, these channels do not lose their high ion throughput. Today, thanks to elucidation of the crystal structure of the  $K^+$  channel from the bacterium *Streptomyces lividans* [Doyle et al. (5); Morais-Cabral et al. (14)], we understand how

this high degree of ion selectivity is achieved. Channel opening and closing is a stochastic process. Transmembrane voltage determines the probability of finding the channels in either state, as in voltage-dependent channels, stretch in mechanosensitive channels, neurotransmitters in neurotransmitter receptor channels, or second messengers such as  $Ca^{2+}$  in  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels (11). Ion selectivity, ion conduction, and channel activation can be characterized using electrophysiological techniques such as patch clamping, which in its different modalities is used to determine single-channel properties [Neher and Sackmann (15), Sackmann and Neher (18)] and

1043 - 4046 / 02 - \$5.00 - COPYRIGHT © 2002 THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY

VOLUME 26 : NUMBER 4 - ADVANCES IN PHYSIOLOGY EDUCATION - DECEMBER 2002

voltage clamping employed when the current induced by a channel population is measured [Hodgkin and Huxley (12)]. Single-channel recordings contain information about the channel conductance, the probability of finding the channel open, and the distribution of open and closed dwelling times. This information is also present in the macroscopic currents measured in an ensemble of many ion channels. However, the process of retrieving this information from macroscopic currents is not straightforward. In this paper, we describe a procedure to analyze the fluctuations (nonstationary noise) in membrane conductance caused by opening and closing of ion channels. Using this methodology, we can reveal the number of channels ( $N$ ) present in a membrane preparation, the unitary current ( $i$ ) carried by a single channel, and the maximum probability of finding the channel open ( $P_{o, \max}$ ). This tutorial is aimed at helping graduate students with solid knowledge of electrophysiology to search for these parameters from macroscopic current records when the need arises. We discuss the theory underlying this procedure and some of its limitations, and we present a step-by-step description of the method with examples generated using a computer program simulation. Sigworth (20) developed the nonstationary noise analysis to study  $\text{Na}^+$  channels. The analysis is simple and powerful and much more comprehensible than those that use correlation functions or spectral densities.

We decided to write this tutorial because the apprentice biophysicist usually approaches membrane noise with apprehension, and we thought it convenient to give the interested scientist a friendly approach with emphasis on the concepts rather than the mathematics of the problem. Moreover, as stated in the preface of Louis de Felice's book (4) ". . . in the intervening years membrane noise became a definable subdivision of membrane biophysics."

This tutorial should be approached as an introductory lecture on noise analysis that should be complemented with the "hands-on" experience given by the educational computer program that we have developed, which is available at [www.cecs.cl](http://www.cecs.cl) (1). Our experience has been that the tutorial is a good primer on the subject and can be handled independently by any Ph.D. student interested in the field and with

some mathematics and physics background. Of course, the word "primer" should be taken in *sensum strictum*, and once the student is enticed by the subject, he/she should continue swimming in the rougher waters of the advanced approaches to noise analysis.

### BASIC CONCEPTS

Classical experiments to characterize a voltage-dependent ion channel require measurement of current relaxation under voltage clamp. Membrane potential is depolarized for a short time, and the current is recorded. The current record contains information about both channel opening (during the depolarization) and channel closing (upon returning to the holding potential). A family of current records is usually studied using a series of stepped voltage pulses (Fig. 1A).

If we assume that the single-channel conductance is independent of the membrane potential, the following relation describes the measured current

$$I(t) = N\gamma P_o(V,t)(V - V_x) \quad (1)$$

where  $I(t)$  is the time-dependent ionic current experimentally observed;  $N$  is the number of channels in the preparation;  $\gamma$  is the single-channel conductance;  $P_o(V,t)$  is the probability of finding the channel open, which is a function of time and membrane potential;  $V$  is the membrane potential, the variable controlled by the voltage-clamp system; and  $V_x$  is the reversal potential of the current.  $V_x$  is usually found using a double-pulse protocol. The prepulse (first pulse) opens the channels, and the test pulse (second pulse) closes the channels. The current measured during the test pulse is the tail current, which will be positive for  $V > V_x$  or negative for  $V < V_x$ . In trials of many different test pulse voltages, a test pulse voltage will be found for which there is no tail current. This voltage is exactly  $V_x$  (Fig. 1B). A plot of  $I$  as a function of  $V$  crosses the current axis at  $V = V_x$ . The product  $N\gamma P_o(V,t)$  is the slope of a cord drawn from  $V_x$  to a given point on the curve and is called the cord conductance.

Unless  $N$  and  $\gamma$  are known, the probability of finding the channel open cannot be determined from a simple analysis of current amplitudes. A classical current relaxation experiment on voltage-dependent channels consists of collecting membrane currents elicited

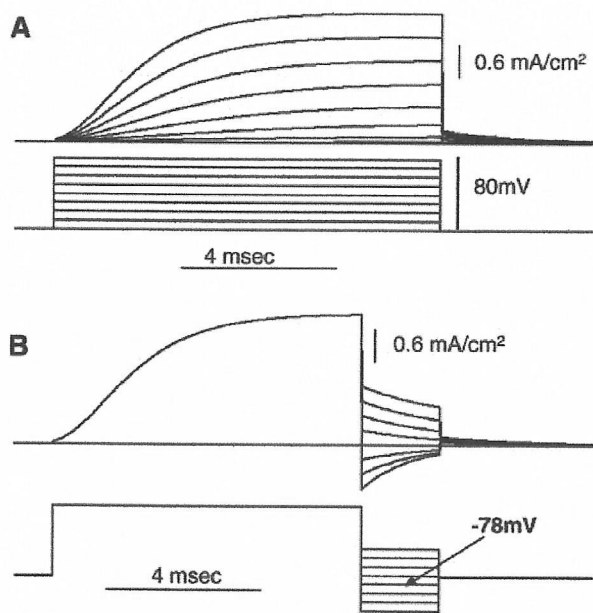


FIG. 1.

**A:** top traces are voltage-clamp macroscopic currents of squid axon K<sup>+</sup> channels during membrane depolarization. Holding potential is  $-67.1$  mV. The membrane was successively depolarized in 10-mV steps, from 0 to 80 for 10 ms as shown in the bottom traces. **B:** double-pulse protocol used to obtain the reversal voltage ( $V_x$ ). Channels were activated by an 80-mV voltage step from the resting potential of  $-67.1$  mV followed by a series of 10-mV voltage steps to set the membrane potential between  $-106$  and  $-36$  mV. For these currents, the reversal potential is  $-78$  mV, since there is no tail current at this membrane potential and the channels are open as can be seen when the voltage returns to the resting potential. Simulations were performed using "nerve" (3).

by a series of voltage pulses of increasing amplitude. Cord conductance,  $I(t)/(V - V_x)$ , is usually an S-shaped curve reaching an asymptotic value within the limit of very high voltages. Conductance as a function of voltage is customarily normalized as a fraction of this limiting value. According to Eq. 1, the maximum cord conductance is  $N\gamma P_{o,max}$ , where  $P_{o,max}$  is the maximum open probability of the channel.  $P_{o,max}$  does not necessarily equal 1. One obvious mechanism producing a  $P_{o,max} < 1$  is channel inactivation, as found in classical sodium channels in nerve (20). A  $P_{o,max} < 1$  can also be found for a voltage-dependent channel in which the last step that opens the channel

is only weakly voltage dependent or is voltage independent. The product  $N$  multiplied by  $\gamma$  cannot be split into the individual terms  $N$  and  $\gamma$  in the classical analysis. Nonstationary noise analysis of the macroscopic current records provides tools to separate  $N$  from  $\gamma$ , and  $P_{o,max}$  can be determined as we describe below (20); for reviews see Heinemann (10), Heinemann and Conti (8), Neher and Stevens (16); for more details, De Felice (4) is recommended].

**Single-channel noise.** We consider a hypothetical ion channel with the following properties: 1) the difference in current between closed and open states is directly proportional to membrane potential; 2) the fraction of channels in the open state varies with membrane potential from 0 to 1 as the voltage increases; 3) the statistics of the number of open channels in membranes with few channels follow a binomial distribution; and 4) the voltage-dependent opening and closing of the channels explain the voltage-dependent properties of a membrane containing many channels. In other words, ion channels act independently of one another [e.g., Ehrenstein et al. (6)].

Figure 2 shows three representative records of a computer simulation of the time course of the current carried by this hypothetical ion channel at three different membrane potentials. Continuous records are split into 10 successive sections as shown. The straight horizontal line in each panel represents the average current recorded when the channel is closed. Channel opening appears as upswings of the current trace. Channels open and close randomly, and it is clear that the probability of finding the channel open is near 0 at 25 mV, about one-half at 45 mV, and close to 1 at 65 mV. There are two classes of current fluctuations (noise) visible in these records. The first class of noise appears as fluctuations of the trace around the closed channel current. These fluctuations are not related to membrane voltage-dependent properties and can be regarded as the equipment background noise.<sup>1</sup> The amplitude of this noise is the same for both an open and a closed channel. The second

<sup>1</sup> However, the current noise in an open channel can be much greater than the baseline noise. This can be caused by open and closed transitions too fast to be followed by the current-measuring system or by the shot noise induced by the statistical motion of ions as they flow through the open channel. These cases will not be

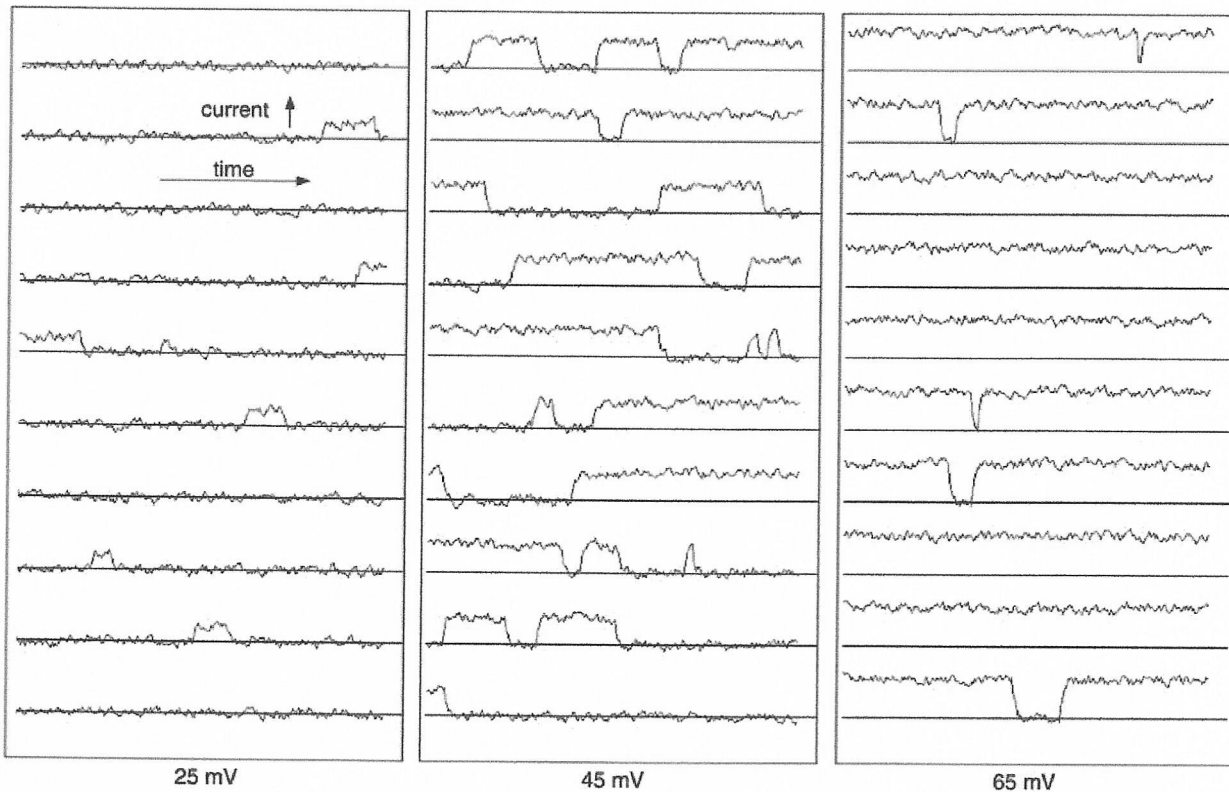


FIG. 2.

Single-channel recording simulations of a voltage-dependent channel. For each time step, a random number ranging between 0 and 1 is generated. If the random number is equal to or smaller than the transition probability, then the channel changes state or else remains in the same state. Simulation proceeds in small time steps to make sure that the probability of a transition for each time step is  $< 1$ . The open-channel current is calculated as the product of the voltage and the single-channel conductance. Gaussian noise is added to all current values to simulate instrumental noise, and the current record is passed through a single-pole passive low-pass filter. Simulations are performed assuming a two-state channel where the kinetic constant  $\alpha$  is the probability per unit time of the channel opening and  $\beta$  is the probability per unit time of the channel closing. Constants  $\alpha$  and  $\beta$  are the voltage-dependent rate constants for each voltage,  $V$ , and are assigned these values:  $\alpha = \alpha(0) \cdot \exp[2(V - 45)/25]$  and  $\beta = \alpha(0) \cdot \exp[-2(V - 45)/25]$ ;  $\alpha = \beta$  when  $V = 45$  mV. The figure represents the time course of the current passing through a membrane with a single channel. Each panel has a continuous recording that has been cut into 10 successive sections for display. Horizontal line marks the baseline current of the closed channel. When the channel opens, current swings upward. Voltage units are mV; current and time units are arbitrary. Each upswing of the current is counted as an event.

class of noise is represented by the current trace that swings upward from the baseline every time the channel opens and that returns to the baseline when the channel closes. This is the noise that is directly related to channel opening and closing. Thus there is a noise impulse (or transition event) every time the channel

discussed here, but the interested reader may consult Heinemann and Sigworth (9, 10).

either opens or closes. The intensity of the noise can be evaluated by counting the number of current transitions observed during a period of time. In Fig. 2, we count 5 opening-closing events in the 25-mV record, where the channel is closed most of the time; 17 similar events in the 45-mV record, where the channel is open one-half of the time; and 5 events in the 65-mV record, where the channel is open most of the time. From this observation, we conclude that channel



noise depends on the probability of finding the channel open [ $P_o(V,t)$ ]. The noise, or the number of transitions, is maximal when the probability of finding the channel open is 0.5, and this must be 0 when the channel is always closed or open. The probability of a transition occurring per unit time is proportional to the total number of channels. Therefore, it is clear that the noise level must depend on  $N$ , the number of channels present in the membrane.

Finally, noise must also depend on the amplitude of the unitary current fluctuation,  $i = \gamma(V - V_x)$ , which is the current carried by a single channel. The following section is the development of a theory that will be used to obtain  $P(V,t)$ ,  $N$ , and  $i$  from the analysis of current fluctuations in membranes with a homogeneous population of channels.

**Mean current and variance.** Let us consider a membrane with just one channel. Let us define  $p$  as the probability of finding the channel open and  $q$  the probability of finding the channel closed. Therefore

$$p + q = 1$$

The mean current  $\langle I \rangle$  passing through the single-channel membrane is the probability of finding the channel open multiplied by the single channel current  $i$ .

$$\langle I \rangle = ip$$

The variance of the current,  $\sigma_i^2$  is the sum of squared deviations from the mean, which can be calculated as the sum of each possible deviation multiplied by its probability.

$$\begin{aligned} \sigma_i^2 &= q(0 - ip)^2 + p(i - ip)^2 \\ &= i^2(p^2q + pq^2) = i^2pq \end{aligned}$$

In a membrane with  $N$  independent channels of the same kind, the mean current and the variance are  $N$  times larger than that of a single-channel membrane

$$\langle I \rangle = Nip \tag{2}$$

$$\sigma^2 = Ni^2pq \tag{3}$$

Combining Eqs. 2 and 3 gives the following expression

$$\sigma_i^2 = i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} \tag{4}$$

Equation 4 is useful for understanding the relationship between noise due to channel gating and the fundamental channel characteristics. Equation 4 is a parabola with roots on  $\langle I \rangle = 0$  and  $\langle I \rangle = iN$ . There will thus be no noise when all of the channels are closed all of the time ( $P_o = 0$ ) or when they are all open all of the time ( $P_o = 1$ ). The first derivative of the function given in Eq. 4 is

$$\frac{d\sigma_i^2}{d\langle I \rangle} = i - \frac{2\langle I \rangle}{N} \tag{5}$$

This derivative becomes zero for  $\langle I \rangle = iN/2$ . Thus the variance has a maximum when the probability of finding the channel open is 0.5. Equation 5 is the slope of the parabola, and within the limit of very small  $\langle I \rangle$  is the single-channel current  $i$ . When all of the channels are open, the mean current is  $iN$ ; therefore, the slope is  $-i$ . In other words, the single-channel current can be obtained from the slope in the neighborhood of either root of the parabola.

This is the basis of the method used to calculate single-channel properties from the current fluctuation in a membrane containing many channels. We simply need to record steady-state current at a fixed potential and to compute the mean and the variance of the current. Once a strategy has been found to change the probability  $p$  to produce a well defined parabola, Eqs. 4 and 5 can be used to compute the number of channels in the membrane, the unitary current, and the maximum probability of finding the channel open.

#### APPLYING THE METHOD TO VOLTAGE-DEPENDENT CHANNELS

An efficient strategy to determine the characteristics of voltage-dependent channels can be designed, since the probability of finding the channels open can be





readily altered. For instance, the  $P_o$  of  $K^+$  channels in an excitable cell such as a neuron will be altered from 0 to  $P_{o,max}$  by changing the membrane potential from  $-70$  mV to  $+50$  mV. The change in  $P_o$  is not instantaneous, but it takes some time to change the open channel probability from zero to a constant steady value;  $P_o$  is a function of time and voltage. Figure 3 shows the result of 14 simulations of the current relaxation for an ensemble of 1,000 channels obtained using the simulation procedure that we released on [www.cecs.cl](http://www.cecs.cl). To compute the variance, the current relaxation experiment can be repeated  $M$  times, so there will be  $M$  measurements of  $I$  for each time point, i.e., for each value of the open-channel probability. The set of  $M$  points taken at any given time is called an isochrone (*iso* - 'equal', *chronos* - 'time'). All points on an isochrone have the same mean value of the open channel probability.

Figure 4 shows nine isochrones taken at different times for 100 current records similar to those of Fig. 3. Dispersion around the mean value is clearly smaller for the lower and upper isochrones where the open-

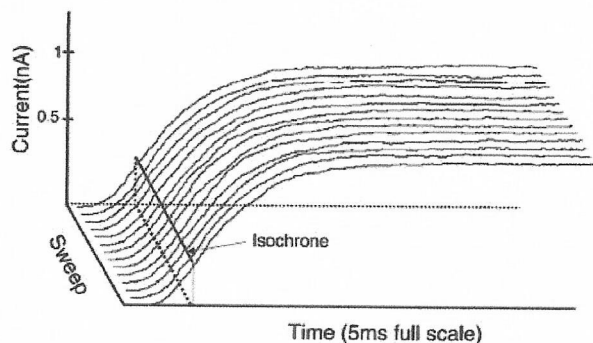


FIG. 3.

Samples of macroscopic currents simulated for voltage-dependent channels with 4 closed states and 1 open state. The simulation procedure is similar to the one outlined for Fig. 2, but here the forward kinetic constants (closed to open) are  $4\alpha$ ,  $3\alpha$ ,  $2\alpha$ , and  $\alpha$ , and backward constants are  $\beta$ ,  $2\beta$ ,  $3\beta$ , and  $4\beta$ . All channels are closed at  $t = 0$  and relax to an open probability near 1. Each of the simulation current records shown is the ensemble average of 1,000 channels with a single-channel current of 1 pA, so the plateau current is close to 1 nA. The collection of data points read at the same time after the beginning of the voltage pulse (solid line parallel to the sweep axis) constitutes an isochrone.

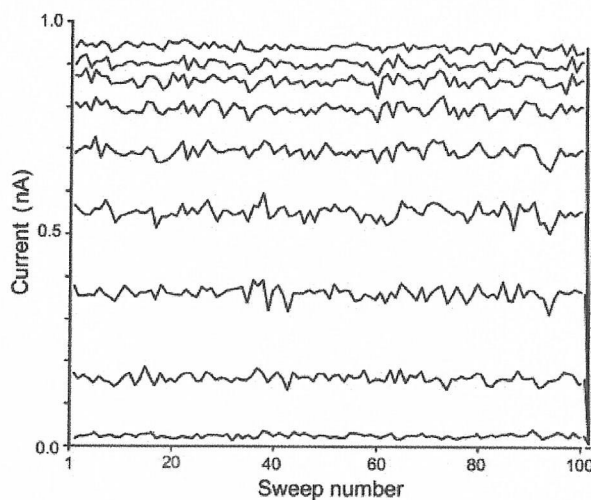


FIG. 4.

Nine isochrones taken at 9 different times. Each trace shows the instantaneous value of the current obtained at the same time after the start of each current relaxation for 100 successive time sweeps, similar to those shown in Fig. 3. Note that the dispersion of the current is small for the extreme values of the current, 0.05 and 0.95 nA, and maximal for the traces taken  $\sim 0.5$  nA. Each simulation consists of 1,000 isochrones.

channel probability is near zero or near 1. It is maximal for the isochrone with a mean current of 0.5 nA, which corresponds to a 50% open probability. The mean current  $\langle I \rangle$  and its variance can be calculated for the points on each isochrone, as the expected probability of the open channel is the same for all the points on a given isochrone. The smooth line of Fig. 5 is a plot of the mean current of each of the 1,000 isochrones collected during the noise simulation as a function of the time after the start of the depolarization pulse at which the isochrone was measured. The jagged line is a plot of the variance of each isochrone as a function of time. The variance has a maximum value at a time at which the mean current is at one-half of its steady-state value. Figure 6 displays the variance as a function of the mean current for all of the 1,000 isochrones collected during the channel simulation. Parameters  $t$  and  $N$  can be obtained by nonlinear curve fitting using Eq. 4. The maximum open probability can be calculated from the maximum mean current recorded,  $\langle I \rangle_{max}$ , divided by

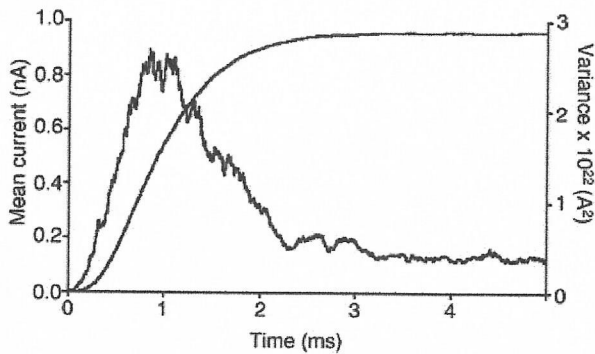


FIG. 5.

Plot of the mean current and variance as a function of time computed for each of the 1,000 isochrones collected during 20 successive depolarizations of a membrane with 1,000 channels. Unitary current was set to 1 pA, and the open probability ( $P_o$ ) relaxed from 0 to 0.9. Note that the variance of the current is maximal at the time when the current is 50% of the steady-state current.

the mean current expected for a membrane with  $N$  open channels

$$P_{o \max} = \frac{\langle I \rangle_{\max}}{iN} \quad (6)$$

**How the variance determination is affected by channel rundown.** Under certain experimental conditions, the current recorded from a membrane may decrease unexpectedly during data collection; this problem is called channel rundown. A simulation of a membrane with channel rundown is shown in Fig. 7. In this simulated experiment, 200 sweeps were collected. The membrane contained 1,000 channels at the beginning of the experiment and only 800 at the end. Figure 7A shows selected isochrones. We can clearly see the scattering of the points along the isochrones and that it is clearly smaller for the lowermost and uppermost traces than for those obtained at relative currents between 0.3 and 0.8. However, this "bird's eye" appreciation of the noise structure in the isochrones is not consistent with the variance calculated using the standard formula as shown in Fig. 7B. Figure 7D is a closer display of an isochrone, and in Fig. 7E the deviations around the mean current are plotted. All deviations are positive for sweeps 1-100 and negative for sweeps 100-200. Because the dispersion is measured with respect to the mean of all

data points, the variance computed from these deviations will reflect mostly the rundown of the channels rather than the random variance of the number of open channels. A better method to calculate the variance relies on measurements of the differences in the current measured on successive sweeps. This method [Heinemann and Conti (8), Sigg et al. (19)] uses the differences ( $y_i$ ) of successive points along the isochrone to calculate the variance, i.e.

$$y_i = \frac{1}{2}(x_i - x_{i+1}) \quad (7)$$

where  $x_i$  is the  $i^{\text{th}}$  point along the isochrone. By use of this transformation, the variance is now given by the expression

$$\sigma_i^2 = \frac{2}{N-1} \sum_1^N (y_i - \bar{y})^2 \quad (8)$$

Figure 7F shows the deviations of the differences with respect to the mean of the differences  $y_i$ . Positive and negative deviations are evenly distributed and represent the random variations of the number of open channels. Figure 7C shows that the variance vs. mean current plot is now a parabola and that the values of

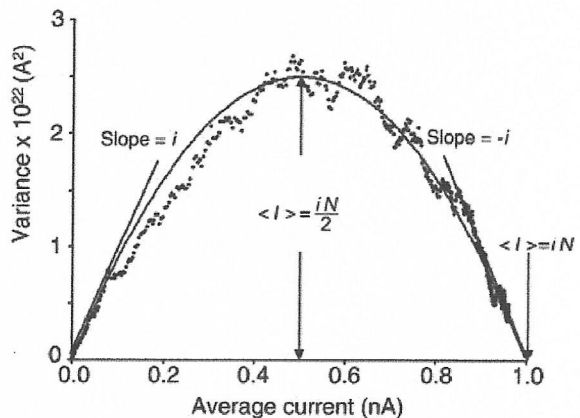


FIG. 6.

Plot of the variance vs. the mean current computed for each of the 1,000 isochrones of a simulation from data in Fig. 5. The slope of the curve at  $I = 0$  is the single-channel current  $i$ . The positive intercept is  $i$  multiplied by  $N$ . The parabola was drawn according to Eq. 4 with  $i = 1$  pA, and  $N = 1,000$ .

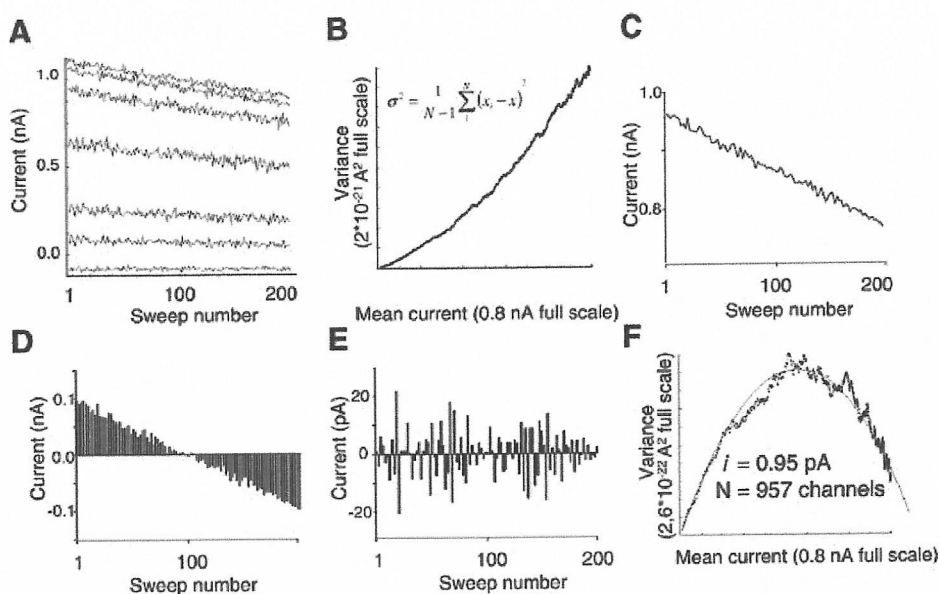


FIG. 7.

Mean-variance analysis in the presence of channel rundown. The membrane simulation initially had 1,000 channels with unitary current of 1 pA. Upon depolarization, the  $P_o$  relaxed from 0 to 0.9 following an exponential time course. The number of active channels decreases by 1 after each simulation of a depolarization, mimicking preparation rundown. We simulated the current of 200 depolarizations so that the membrane had 800 active channels on the last sweep. *A*: samples of isochrones showing the current rundown. *B*: variance vs. mean current plot of all 1,000 isochrones of the simulation. If data are not corrected for rundown, the variance grows indefinitely; this is because the current drift is proportional to the total current. Values for  $i$  and  $N$  cannot be retrieved from this analysis. *C*: a single isochrone displayed in an expanded scale. *D*: by use of the data in *D*, a bar plot of the deviations of the current of isochrone around the mean was constructed. *E*: bar plot of the differences between the current of successive sweeps corrected for the mean of the differences. The variance due to the random channel noise that is free from the artifact introduced by rundown can be calculated from these differences, and the result is shown in *F*. *F*: mean-variance plot obtained from the differences shown in *E* by use of the procedure of Heinemann and Conti (8), Sigg et al. (19), and Noceti et al. (17). The plot is now a parabola, and the correct values of  $i$  and  $N$  can be accurately retrieved.

$i$  and  $N$  obtained from the fit to the data using Eq. 8 are the expected ones.

**How many channels in the membrane and how many repetitions are required for reliable measurements of  $i$  and  $N$ ?** In measuring macroscopic currents, we know that the relative current noise increases as the magnitude of the measured current decreases. Having large currents is thus convenient when the objective is a "clean" current record, but this can be a disadvantage when determining  $i$  and  $N$

by use of noise analysis. This is because we are measuring the difference between the mean current and the current measured at a given time in the different current sweeps, and this difference, as we show below, will vanish as the  $\langle I \rangle$  becomes very large. Recalling Eqs. 2 and 3, and assuming that  $P_o = 0.5$  for the sake of simplicity, we have

$$\frac{\sqrt{\sigma_i^2}}{\langle I \rangle} = \frac{1}{\sqrt{N}}$$

This implies that, for a very large  $N$ , the standard deviation of  $I$  at any given time will be too small compared with  $\langle I \rangle$  to be measured accurately. This is especially important when using analog-to-digital conversion, since the minimum current difference that can be measured is one bit. In a 12-bit system, this is 1 part in 4,096. For example, let us consider a membrane with 10 channels, and we adjust our data acquisition system so the full amplitude of the macroscopic current is represented in 1,000 digital counts. Therefore, the unitary current is represented by 100 digital counts. To calculate the variance of the isochrones, we calculate the differences of the current recorded on successive sweeps. Figure 8A illustrates the differences recorded in the 10-channel membrane. The first six differences are 1, -1, 1, 0, 2, and -4 channels, which are accurately represented by 100, -100, 100, 0, 200 and -400 digital counts. Let us now consider a 10,000-channel membrane, in which we adjust the system so that the macroscopic current is represented again by 1,000 digital counts. In this case, each digital count will represent 10 channels. Figure 8B shows the current differences computed for this membrane, and we can see that all of the differences are multiples of 10 channels. This is an error introduced by the analog-to-digital conversion, since the actual differences are any integer number of channels. In this situation, our noise analysis will be inaccurate.

Our experience tells us that the accuracy of a determination depends on the size of the sample. This is also true for the mean-variance noise analysis. The accuracy of the determinations depends strongly on the number of sweeps collected during the experiments, i.e., the number of data points on each isochrone. As an example, we simulated the channel noise of a membrane with 1,000 channels and collected 100 sweeps. The standard deviation of a sample of 10 determinations was 20% of the central value for both the unitary current and the number of channels. Repeating the same procedure, but collecting 1,000 sweeps on each trial, reduced the standard deviation to 4%.

**How reliable is the analysis when the experimental data cover only part of the parabola?** Figure 9 shows a series of simulations in which the open-channel probability was explored to different

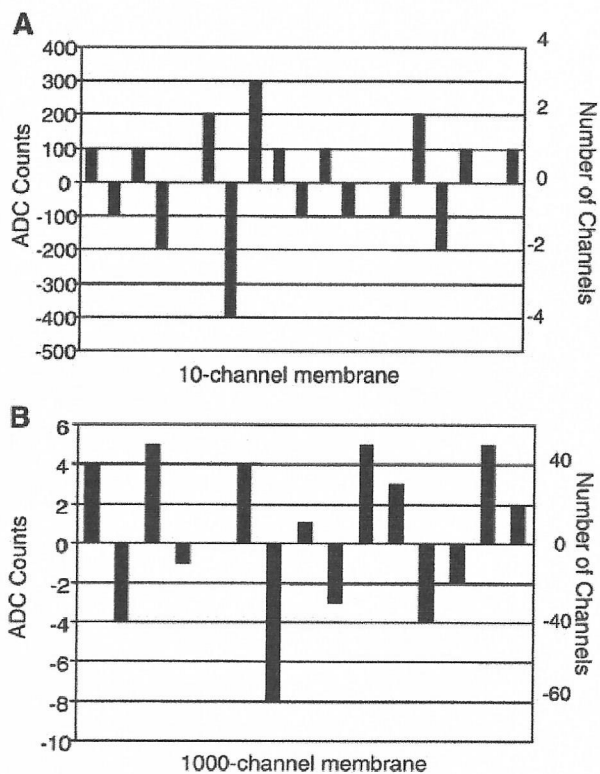


FIG. 8.

Current differences between successive isochrones. The analog signal was digitized using an analog-to-digital converter (ADC) that represents the full macroscopic current on 1,000 counts. *A*: current differences computed for a 10-channel membrane, where the current of a single channel is converted into 100 digital counts. In this case, the differences computed are accurate representations of the channel noise. *B*: differences computed in a 10,000-channel membrane, where each digital count represents 10 channels. In this case, the differences computed are a poor representation of the channel noise.

extents. Figure 9A represents the ideal case, where the open-channel probability changed from 0 to 1, and we thus have experimental points over the complete parabola. In Fig. 9B, the open-channel probability changed only from 0 to 0.1. In this case, the data look like a straight line rather than a parabola. In other words, only the slope of the variance-mean relation can be accurately calculated in this case. As mentioned earlier, the absolute value of the slope of the parabola near the roots is the unitary current  $i$ . Therefore, in this case, we can determine the unitary cur-

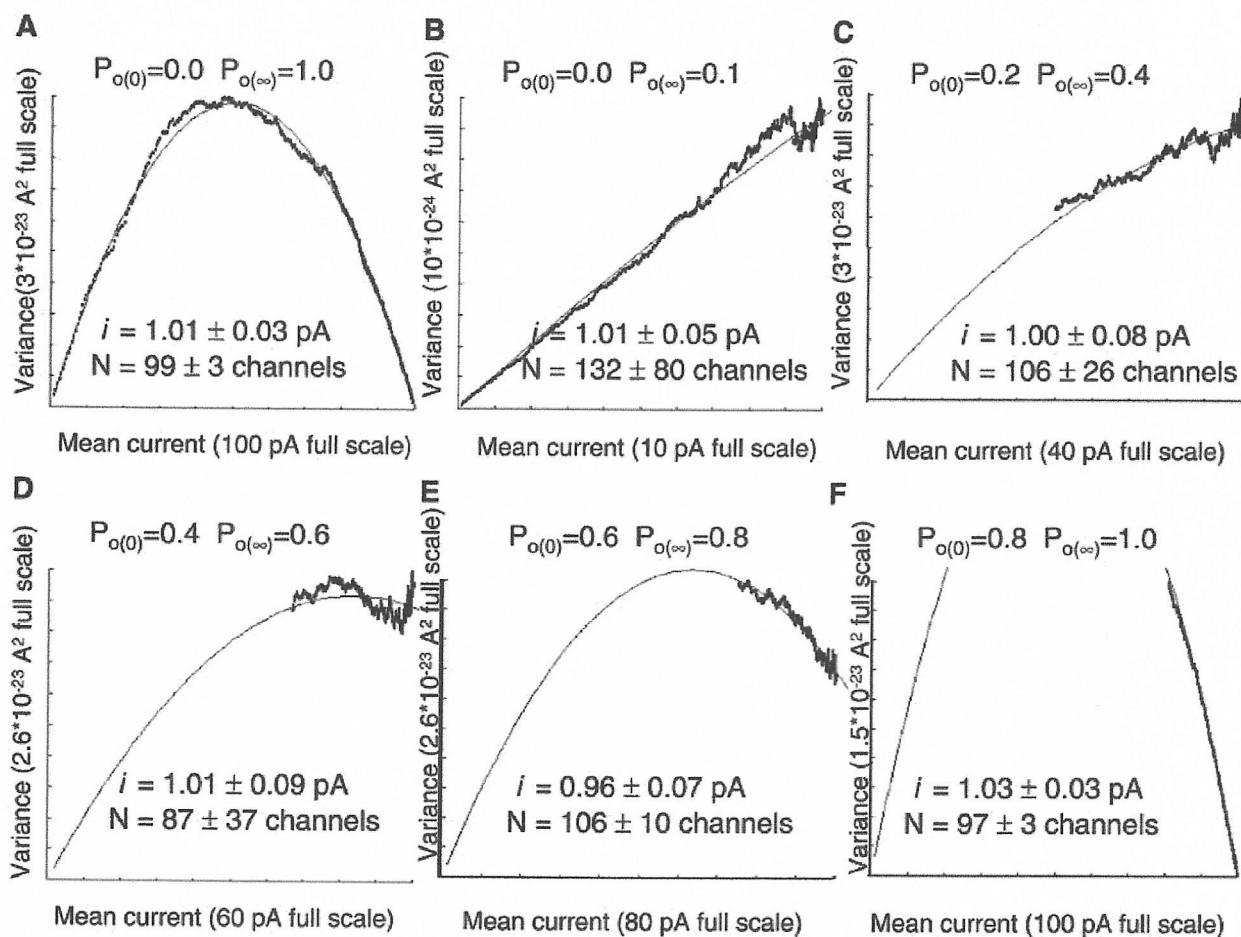


FIG. 9.

Exploration of the reliability of noise analysis under less than ideal conditions. Simulations were run setting the initial  $P_{o(0)}$  and final  $P_{o(\infty)}$  open-channel probability to different values as indicated at the top of each plot. The best least square parabola was fitted to the mean-variance experimental points computing single-channel current and the number of channels. Estimations of  $i$  and  $N$  were repeated 10 times for each experimental condition to compute a mean and a standard deviation of the sample, as shown under each curve. Note that the estimation of the single-channel current  $i$  is reliable for all cases shown here, *mirabile dictu*, even when the open time probability swings from 0.4 to 0.6. The number of channels in the membrane,  $N$ , is accurately determined only when data points are experimentally measured at an open-channel probability near 1.

rent but not the number of channels in the membrane. While producing the simulations for this tutorial, we were surprised to find that the unitary current can be estimated fairly accurately even for very limited explorations of the open probability space as shown in Fig. 9, C, D, and E. However, the number of active channels in the membrane,  $N$ , cannot be calculated accurately for situations where the complete parabola cannot be experimentally attained.

In Fig. 9F, we show a case in which the open-channel probability changed from 0.8 to 1. Despite the limited data points used to search for the best parabola, the fit gave accurate values for  $i$  and  $N$  (see Fig. 9A).

Figure 10 shows another situation where  $P_o$  never reaches 1.0 because of channel inactivation. In this case, the kinetic scheme has three states: closed, open, and inactivated, in which only the open state



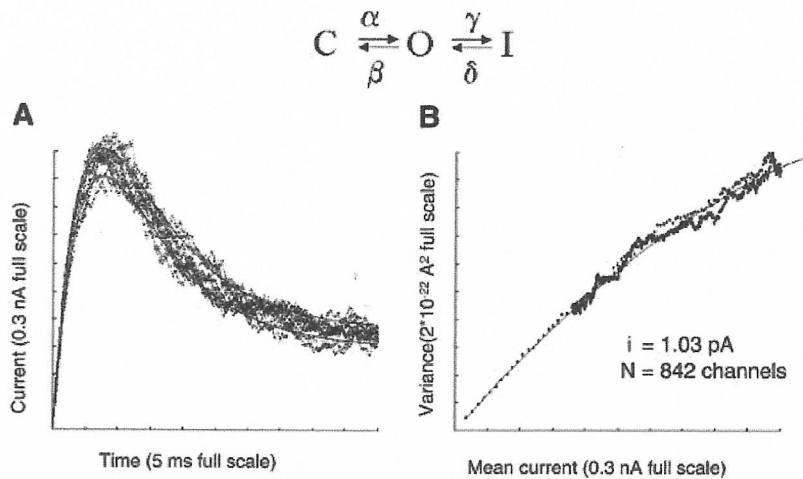


FIG. 10.

Noise analysis of channels that inactivate. Macroscopic currents were simulated for a membrane with 1,000 channels, with a unitary current of 1 pA for the open channel. Channel inactivation according to the kinetic scheme is shown in *A*, where state *O* carries current and states *C* and *I* are closed. *A*: superimposed image of 1,000 sweeps recorded. *B*: variance vs. mean current plot. Data points that appear separate, from low mean current to the maximum, correspond to the activation phase of the current. The points shown closer together correspond to the inactivation phase. All points are described well by the same parabola. Kinetic constants were  $\alpha = 1,000 \text{ s}^{-1}$ ,  $\beta = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\gamma = 2,000 \text{ s}^{-1}$ , and  $\delta = 200 \text{ s}^{-1}$ .

carries current. Upon depolarization, channels are briefly in the open state and then proceed to the inactivated state. The time course of the current is represented in Fig. 10, in which the currents measured during several repeat experiments are superimposed. Current rises quickly and then decreases slowly to a steady-state value. The variance is plotted as a function of the mean current for each isochrone in Fig. 10*B*. It is clear from this figure that the data fit using Eq. 4 effectively reproduces  $i$  but not  $N$  (actual number of channels is 1,000). It is interesting to note that time does not appear in the equation relating variance to the mean current. This means that the parabola can be drawn from  $P_o = 0$  to  $P_o = 1$  as well as from  $P_o = 1$  to  $P_o = 0$ . This is why the sparse points belonging to the fast upstroke of the current as well as those closely spaced points belonging to the slower inactivation all fall on the same parabola.

**Beware of the filter!** It is our daily experience that passing the current record through a low-pass filter

will reduce the noise. Thus we can anticipate that filtering will interfere with noise analysis. This is illustrated in Fig. 11, in which we filtered currents before performing noise analysis. The model we used is a two-state channel with a relaxation time of 1 ms. Filters with time constants of 0.3, 0.1, and 0.03 times the channel time constants were used. The distortion of the parabola and the errors in  $i$  and  $N$  are apparent when compared with the no-filter analysis. The lesson that we have drawn from of this example is that the filter must be set to a time constant well below those that describe channel gating. Because the rate of opening and closing of the channels may be unknown, demonstration of the stability of the results using different filters is mandatory.

The estimations of both  $i$  and the  $P_{o \text{ max}}$  can be seriously affected by choosing an incorrect filtering procedure, for example, in the case of a channel with a fast (flickering) between the open state and



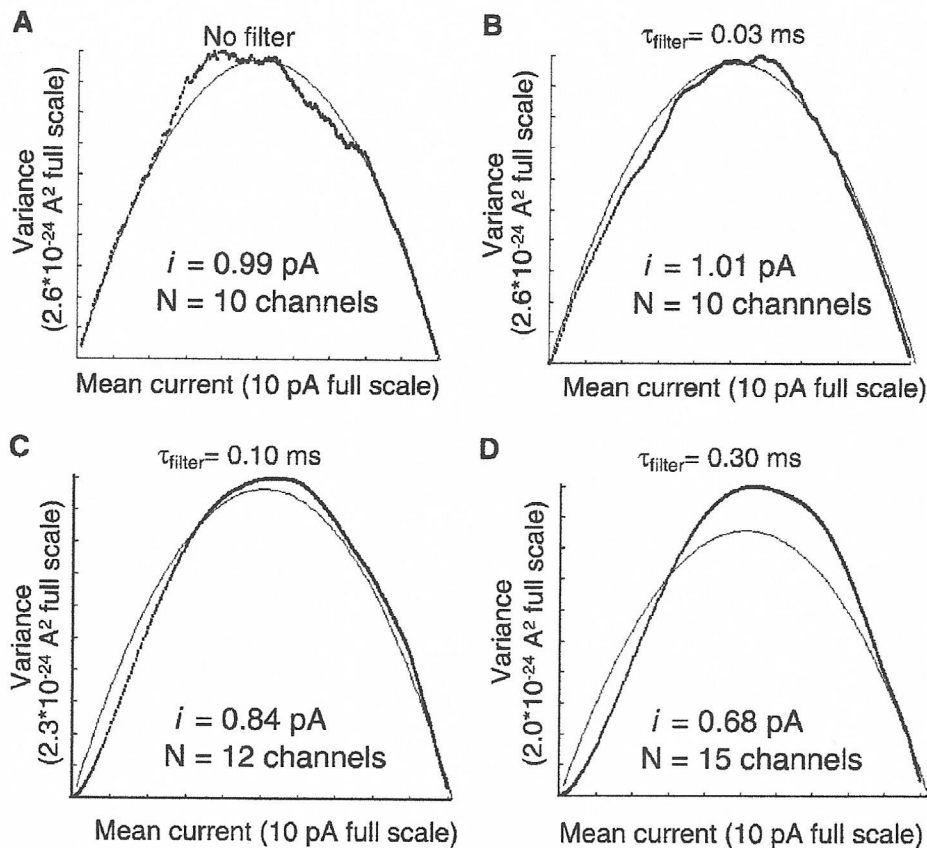


FIG. 11.

Noise analysis and low-pass filtering of the current signal. We simulated the relaxation of open-channel probability from 0 to 1.0 following an exponential time course with a time constant of 1 ms. Current records were filtered using an 8-pole Bessel low-pass filter. The  $-3$ -dB frequency of the filters used were 7,950, 1,590, and 795 Hz, corresponding to time constants of 0.03, 0.10, and 0.3 ms, respectively.  $\tau_{\text{filter}}$  is the time constant indicated at the top of each plot. The retrieved values for unitary current and the number of channels are shown under each plot. The analysis yields correct results when the filter time constant is less than one-tenth of the channel relaxation time. Note the foot of the plot seen for low open-channel probability. This foot indicates that the single-channel current can no longer be calculated from the slope of the variance vs. mean current plot at low mean current (see Fig. 9B).

the closed state. The kinetic scheme of the simulation shown in Fig. 12 has two closed and one open state,  $C_1$ ,  $C_2$ , and O. Exchange between the  $C_2$  and O states is much faster than that between the  $C_1$  and  $C_2$  states. Upon depolarization, channels shift from state  $C_1$  to  $C_2$  and then reaches the state O. Figure 12A shows noise analysis performed in the absence of filtering. The analysis retrieves the cor-

rect values for  $i$ ,  $N$ , and  $P_{O \text{ max}}$ . Introducing a 10-kHz filter has the effect of halving  $i$  and increasing the  $P_{O \text{ max}}$  with almost no effect on the number of channels (Fig. 12B). The filter in this case eliminates the flicker collapsing the channel current, and since the filter eliminates the fast closing events the mean open time increases with consequent increase in  $P_{O \text{ max}}$ .

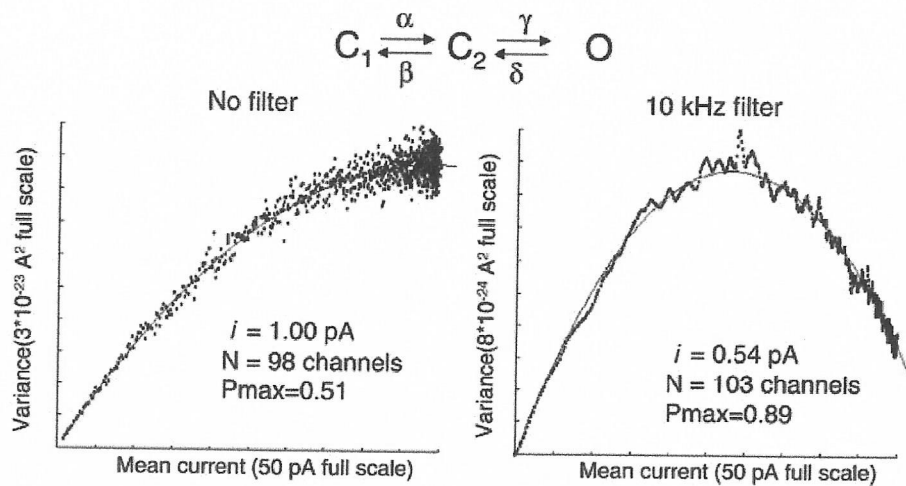


FIG. 12.

Flickering channels. This figure demonstrates the false results obtained for channels that flicker. To simulate these channels, we used the closed-closed-open scheme, as shown on top. Simulation begins with all channels in the closed state. After a first latency of 1 ms, channels enter a flickering state, opening and closing at a fast rate. The probabilities of finding the channel in the open or closed states are set to be equal, so the open probability in steady state is 0.5. The unitary current is 1 pA, and the number of channels (*N*) is 100. The simulation was run for 1,000 sweeps. *Left*: mean-variance plot in an ideal case where there is no filter. In this case, the analysis correctly retrieves *i*, *N*, and *P*<sub>o,max</sub>. *Right*: In this case, the current records are filtered using an 8-pole 10-kHz low-pass filter, the noise due to channel flicker is attenuated, and the analysis gives a false low unitary current and a false high maximum *P*<sub>o</sub> (*P*<sub>max</sub>, i.e., *P*<sub>o,max</sub>). Rate constants were  $\alpha = 1 \text{ ms}^{-1}$ ,  $\beta = 0$ ,  $\gamma = 100 \text{ ms}^{-1}$ , and  $\delta = 100 \text{ ms}^{-1}$ .

### NOISE ANALYSIS OF MACROSCOPIC CURRENTS OBTAINED USING THE PATCH-CLAMP TECHNIQUE

We close this tutorial by showing real data obtained using the patch clamp technique. The macroscopic current record shown in Fig. 13A is from a membrane macropatch in *Xenopus laevis* oocyte. In this case, the oocyte expressed calcium-activated K<sup>+</sup> channels (K<sub>Ca</sub>, human *Slowpoke*). Using the same technique, we recorded outward currents flowing through *Shaker*H4Δ-(6-46) K<sup>+</sup> channels (Fig. 13D). Plots of variance vs. current corresponding to the raw data shown in Figs. 13, B and E and plots of variance vs. mean current are given in Figs. 13, C and F. The solid line is a fit to the data by using Eq. 4, yielding an estimate of the single-channel current, the number of channels contained in the

patches, and the maximum probability of opening for K<sub>Ca</sub> and *Shaker* K<sup>+</sup> channels. These values can be converted to an estimate of the single-channel conductance dividing them by the driving force, which is 120 mV, because the internal and external K<sup>+</sup> concentration were the same. The values of single-channel conductances obtained for the K<sub>Ca</sub> and the *Shaker* channel were 175 pS and 12 pS, respectively. These values compare well with those measured directly from unitary currents.

This work was supported by Chilean grants Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica 1000890 (R. Lattore) and Cátedra Presidencial, a Human Frontiers in Science Program, a group of Chilean companies (Compañía del Cobre, Dimacofi, Empresas CMPC, MASISA, and Telefónica del Sur). The Centro de Estudios Científicos is a Millennium Science Institute.

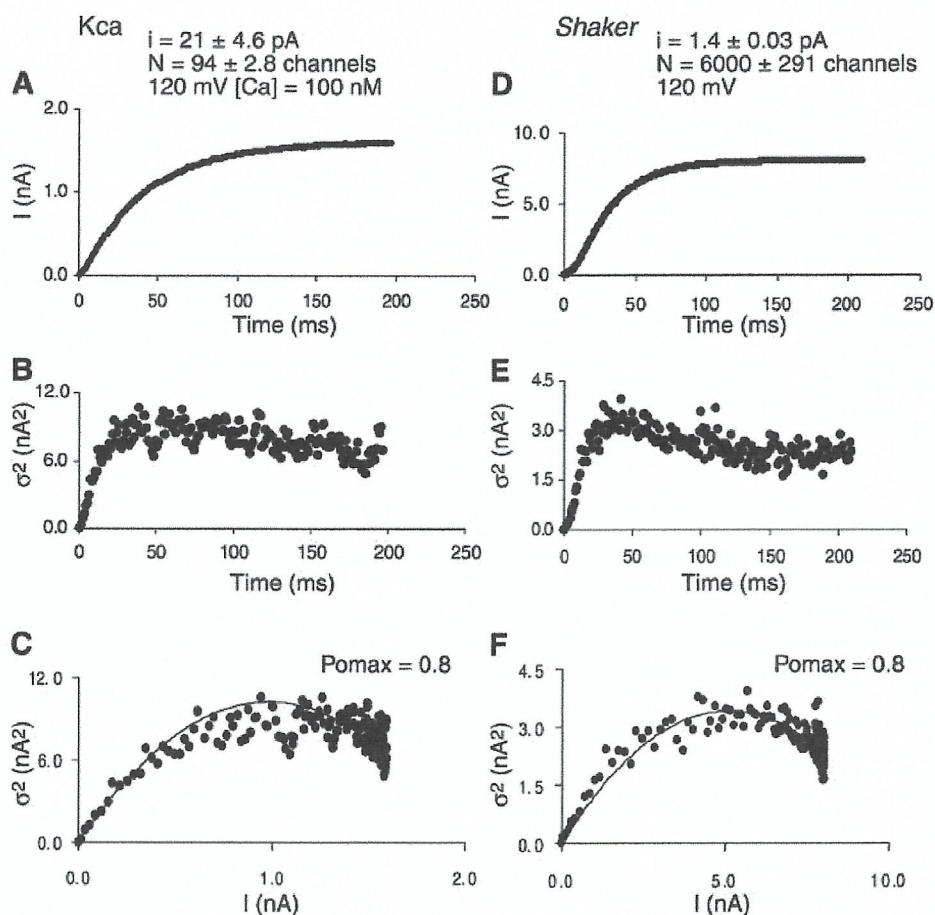


FIG. 13.

Nonstationary noise analysis of outward potassium currents flowing through calcium-activated  $K^+$  channels ( $K_{Ca}$ ) and *Shaker*H4 $\Delta$ -(6–46). Channels were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and detected using the macropatch technique. *A* and *D*: mean current traces obtained from 256 traces recorded with the patch technique for a holding potential of 0 mV (*A*,  $K_{Ca}$  channel) or  $-100$  mV [*D*, *Shaker*H4 $\Delta$ -(6–46) channel] to a test pulse potential of 120 mV. In the case of the  $K_{Ca}$  channel, the internal  $Ca^{2+}$  concentration was 100 nM. *B* and *E*: time course of the variance for the  $K_{Ca}$  and the *Shaker*H4 $\Delta$ -(6–46) channel, respectively. *C* and *F*: variance vs. mean current fitted to Eq. 4 for the  $K_{Ca}$  and the *Shaker*H4 $\Delta$ -(6–46) channel, respectively.

Address for reprint requests and other correspondence: R. Latorre, Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia, Chile (E-mail: ramon@cecs.cl).

Received 8 February 2002; accepted in final form 20 August 2002

## REFERENCES

1. Alvarez O, Gonzalez C, and Latorre R. *Noise Simulation, a Teaching Computer Program*. www.cecs.cl.
2. Begeisich T and Stevens CF. How many conductance states do potassium channels have? *Biophys J* 15: 843–846, 1975.
3. Bezanilla F. *Electrophysiology and Molecular Basis of Excitability*. <http://pb010.anes.ucla.edu/nervelt/nervelt.html>.
4. De Felice LJ. *Introduction to Membrane Noise*. New York: Plenum, 1981.
5. Doyle D, Morais-Cabral J, Pfuetzner R, Kuo A, Gulbis J, Cohen S, Chait B, and MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77, 1998.

6. **Ehrenstein G, Lecar H, and Nossal R.** The nature of the negative resistance in bimolecular lipid membranes containing excitability-inducing material. *J Gen Physiol* 55: 119-133, 1970.
7. **Heinemann SH.** Guide to data acquisition and analysis. In: *Single Channel Recording*, edited by Sackmann B and Neher E. New York: Plenum, 1995, p. 53-91.
8. **Heinemann SH and Conti F.** Nonstationary noise analysis and application to patch clamp recordings. *Methods Enzymol* 207: 131-148, 1992.
9. **Heinemann SH and Sigworth FJ.** Open channel noise. IV. Estimation of rapid kinetics of formamide block in gramicidin A channels. *Biophys J* 54: 757-764, 1988.
10. **Heinemann SH and Sigworth FJ.** Open channel noise. V. Fluctuating barriers to ion entry in gramicidin A channels. *Biophys J* 57: 499-514, 1990.
11. **Hille B.** *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.
12. **Hodgkin AL and Huxley AF.** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544, 1952.
13. **Latorre R and Miller C.** Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* 71: 11-30, 1983.
14. **Morais-Cabral JH, Zhou Y, and MacKinnon R.** Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414: 37-42, 2001.
15. **Neher E and Sakmann B.** Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258: 705-729, 1976.
16. **Neher E and Stevens CF.** Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6: 345-381, 1977.
17. **Noceti F, Baldelli P, Wei X, Qin N, Toro L, Birnbaumer L, and Stefani E.** Effective gating charges per channel in voltage-dependent K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol* 108: 143-155, 1996.
18. **Sackmann B and Neher E.** The patch clamp technique. *Sci Am* 266: 44-51, 1992.
19. **Sigg D, Stefani E, and Bezanilla F.** Gating current noise produced by elementary transitions in Shaker potassium channels. *Science* 264: 578-582, 1994.
20. **Sigworth FJ.** The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Gen Physiol* 307: 97-129, 1980.



## Structure and function of potassium channels in plants: some inferences about the molecular origin of inward rectification in KAT1 channels (Review)

R. Latorre†‡\*, F. Muñoz†, C. González† and D. Cosmelli†

† Centro de Estudios Científicos, Arturo Prat 514, Valdivia, Chile

‡ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

### Summary

Potassium channels in plants play a variety of important physiological roles including K<sup>+</sup> uptake into roots, stomatal and leaf movements, and release of K<sup>+</sup> into the xylem. This review summarizes current knowledge about a class of plant genes whose products are K<sup>+</sup> channel-forming proteins. Potassium channels of this class belong to a superfamily characterized by six membrane-spanning domains (S1–6), a positively charged S4 domain and a region between the S5 and S6 segments that forms the channel selectivity filter. These channels are voltage dependent, which means the membrane potential modifies the probability of opening ( $P_o$ ). However, despite these channels sharing the same topology as the outward-rectifying K<sup>+</sup> channels, which are activated by membrane depolarization, some plant K<sup>+</sup> channels such as KAT1/2 and KST1 open with hyperpolarizing voltages. In outward-rectifying K<sup>+</sup> channels, the change in  $P_o$  is achieved through a voltage sensor formed by the S4 segment that detects the voltage transferring its energy to the gate that controls pore opening. This coupling is achieved by an outward displacement of the charges contained in S4. In KAT1, most of the results indicate that S4 is the voltage sensor. However, how the movement of S4 leads to opening remains unanswered. On the basis of recent data, we propose here that in plant-inward rectifiers an inward movement of S4 leads to channel opening and that the difference between it and outward-rectifying channels resides in the mechanism that couples gating charge displacement with pore opening.

**Keywords:** Plant K<sup>+</sup> channels; KAT1; inward rectification.

**Abbreviations:** MTSET, trimethylammoniummethylmethanesulfonate; Kv, voltage-dependent K<sup>+</sup> channels; KAT-1, potassium channel of *Arabidopsis thaliana*; HERG, human ether a-go-go-related gene.

### Introduction

Potassium transport processes play a fundamental role in plant cell physiology. Potassium ion (K<sup>+</sup>) movements across the cell membrane are involved in leaf movement, cell elongation, plant growth and development and in the regulation of stomatal aperture (for reviews, see Schroeder *et al.* 1994, Cherel *et al.* 1996, Maathuis *et al.* 1997, Fox and Gueriot 1998). Potassium is the dominant cation within the

vacuole and accumulation of K<sup>+</sup> inside this organelle is essential for generating the turgor pressures that drive cell expansion. K<sup>+</sup> transport in plants is mediated by carriers and channels and customarily divided in high- and low-affinity K<sup>+</sup> uptake (Epstein *et al.* 1963). High-affinity K<sup>+</sup> transport is defined as the K<sup>+</sup> influx that occurs when the external K<sup>+</sup> concentration is in the range of 1–200  $\mu$ M (e.g. Fox and Gueriot 1998) and it was thought to be mediated exclusively by carriers. However, as will be shown, this definition has been questioned (Hirsch *et al.* 1998). On the other hand, it was thought that K<sup>+</sup> channels were responsible for K<sup>+</sup> uptake when the external concentration of K<sup>+</sup> was > 0.3 mM (low-affinity K<sup>+</sup> uptake). The driving force for K<sup>+</sup> uptake is the large negative membrane potential imposed by the proton pump that ranges from –230 to –120 mV (Slayman 1987, Hirsch *et al.* 1998). However, these values are underestimated because the shunt resistance between the microelectrode and the cell membrane tends to depolarize the cell. A membrane potential of –230 mV, assuming an internal K<sup>+</sup> concentration of 150 mM, should, in principle, allow channel-mediated K<sup>+</sup> uptake even at an external potassium concentration as low as 15  $\mu$ M. The genes whose products function in the transport of K<sup>+</sup> have been identified and code for inward rectifier channels that surprisingly have a membrane topology similar to animal delayed rectifier K<sup>+</sup> channels such as *Shaker*.

### Potassium channel diversity, structure and physiological role

In plants, potassium uptake is mediated by voltage-dependent inward rectifiers that belong to a superfamily of ion channels denominated by the S4 superfamily that includes Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels (Jan and Jan 1992). KAT1 and AKT1 (Figure 1A) were the first inward rectifier K<sup>+</sup> channels cloned from the plant *Arabidopsis thaliana* (Anderson *et al.* 1992, Sentenac *et al.* 1992, Schachtman *et al.* 1992, Véry *et al.* 1995, Gaymard *et al.* 1996, Bertl *et al.* 1997). In general, cloned plant channels have been expressed and characterized electrophysiologically in heterologous systems, usually *Xenopus laevis* oocytes. Plant channels have also been expressed in yeast (Bertl *et al.* 1997), in insect cells (line Sf9; Gaymard *et al.* 1996), and COS and CHO cells (Szabò *et al.* 2000, Dreyer *et al.* 2001). The KAT1 channel is expressed in guard cells and the vascular system of the stem. AKT1 is present in guard cells (e.g. Szyroki *et al.* 2001) and in the root cortex and it plays an important role in K<sup>+</sup> uptake from the soil. Hirsch *et al.* (1998) identified an *A. thaliana* mutant in which the AKT1 channel gene was disrupted. The mutant showed a reduced K<sup>+</sup> uptake and grew poorly on media containing < 100  $\mu$ M K<sup>+</sup>. These findings support the notion (Schroeder *et al.* 1994) that a channel mediates, at least in part, what has previously been termed as high-affinity uptake. A gene encoding a guard cell K<sup>+</sup> channel, KST1,

\*To whom correspondence should be addressed at. Centro de Estudios Científicos, Arturo Prat 514, Valdivia, Chile.  
e-mail: ramon@cecs.cl



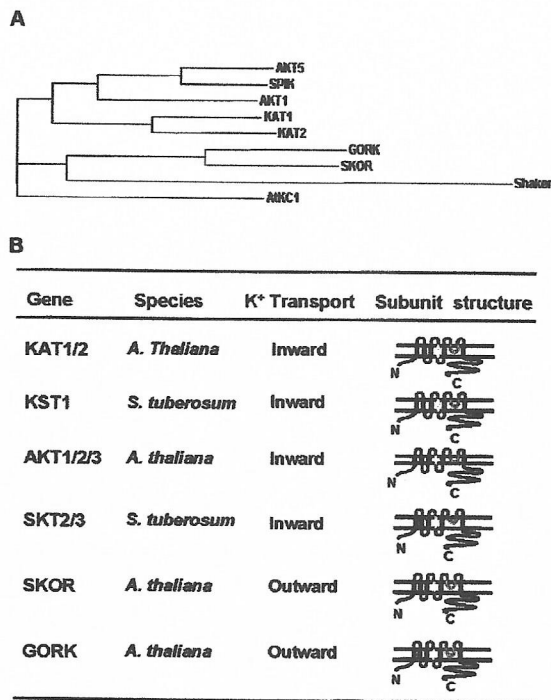


Figure 1. (A) Dendrogram of plant potassium channels. Comparison of the amino acid sequences of nine  $\alpha$ -subunits for plant K<sup>+</sup> channels. The more similar the sequences for a pair of genes, the shorter the path connecting them. The *Shaker*  $\alpha$ -subunit is more similar to the  $\alpha$ -subunits of GORK and SKOR that are outward rectifier channel-forming proteins. Calculations were made by the Clustal algorithm. (B) Plant K<sup>+</sup> channels and associated subunits. The possible transmembrane topology of channel subunits is given in the far right column. The S4 segment is depicted in pale grey, the pore in deep grey.

was cloned from a *Solanum tuberosum* cDNA library based on its similarity to KAT1 (Muller-Rober *et al.* 1995). KST1 is also present in flowers, albeit at a low level. Six K<sup>+</sup> channel genes have been identified in *A. thaliana* and *S. tuberosum*: AKT1/2/3 and SKT1/2/3 (Cao *et al.* 1995, Gaymard *et al.* 1995, 1996, Ehrhardt *et al.* 1997, Zimmermann *et al.* 1998, Dreyer *et al.* 2001). AKT2/3 are weakly voltage-dependent and blocked by external Ca<sup>2+</sup> and protons (Marten *et al.* 1999). AKT3 is predominantly expressed in the phloem and represents a truncated version of AKT2 characterized by a 15-amino acid shorter cytoplasmic N terminus (Cao *et al.* 1995, Lacombe *et al.* 2000). Functional expression of SKT1 channels in *Xenopus* oocytes has been unsuccessful, a phenomenon also observed for AKT1. However, co-injection of *skt1* and *akt1* cRNAs into oocytes induced strong inward rectifying K<sup>+</sup> current indicating that SKT1 and AKT1 subunits were able to associate and form healthy K<sub>in</sub><sup>+</sup> channels (Dreyer *et al.* 1997). SKT1 and AKT1 channels were successfully expressed using the baculovirus/insect cell system (Gaymard *et al.* 1996, Zimmermann *et al.* 1998). Philippar *et al.* (1999) isolated and functionally expressed two inward rectifiers from corn: ZMK1 and ZMK2 (*Zea mays* K<sup>+</sup> channel 1 and 2). In corn, they found that coleoptile bending and growth depends on the transcriptional up-regulation of

ZMK1. AKT2 and ZMK2 channels mediate both K<sup>+</sup> influx and efflux. These channels mediate both instantaneous 'leak-like' and time-dependent hyperpolarization-activated currents. More recently, Pilot *et al.* (2001) cloned KAT2, a twin brother of KAT1, which is also present in guard cells. It was suggested that KAT1 played a crucial role in stomatal opening (e.g. Nakamura *et al.* 1995). However, Szyroki *et al.* (2001) using KAT1 knockout mutant of *Arabidopsis* showed that the channel is not essential for this particular physiological role. Multiple inward rectifiers coexpress in guard *Arabidopsis* cells including KAT2, AKT1 and AKT2/3 and all may play a role in stomatal opening. Hedrich's group (Dreyer *et al.* 1997, Reintanz *et al.* 2002) cloned a modulatory silent  $\alpha$ -subunit, AtKC1. AtKC1, expressed in root cells, forms heteromeric inward rectifiers with the  $\alpha$ -subunit of KST1 and the mutant channel KAT1-S168R (Dreyer *et al.* 1997) and with the  $\alpha$ -subunit of AKT1 (Reintanz *et al.* 2002). The heteromeric channel has a clearly distinct gating and cation sensitivity when compared with channels formed only by AKT1  $\alpha$ -subunits (Reintanz *et al.* 2002). The inward rectifier AKT6 (Mäser *et al.* 2001) (Figure 1A) is exclusively expressed in the pollen grains and has been renamed as SPIK (*Shaker* pollen inward K channel) by Mouline *et al.* (2002). SPIK play an important role in K<sup>+</sup> uptake in pollen tube development.

Outward rectifier K<sup>+</sup> channel genes were also cloned from *A. thaliana*: SKOR (Gaymard *et al.* 1998) and GORK (Ache *et al.* 2000). SKOR is present in root stelar tissues and its role is to release K<sup>+</sup> into the xylem sap. On the other hand, GORK is an outward rectifier expressed in guard cells and it may be the channel in charge of K<sup>+</sup> secretion from these cells. Figure 1A shows a dendrogram comparing the amino acid sequences of eight  $\alpha$ -subunits for plant K<sup>+</sup> channels. The more similar the sequences for a pair of genes, the shorter the path connecting them.

As can be appreciated in Figure 1B, inward rectifiers and SKOR channels share the same subunit structure. The structure consists of six transmembrane domains (S1–6) and a pore domain (P) linking segments S5 and S6. The S4 domain contains conserved, regularly spaced, positively charged amino acid residues (Figure 2A). The pore region is extremely well conserved and contains the sequence TXGYG (Figure 2B) that form part of the selectivity filter in the bacterial KcsA channel (Doyle *et al.* 1998), where X can be a T or a V. Many different K<sup>+</sup> channel genes in metazoans have this same basic structure (e.g. Hille 2001). The first K<sup>+</sup> channel gene cloned was *Shaker* from the fly *Drosophila melanogaster* (Tempel *et al.* 1987) and the first homologue cloned from mammals was denominated Kv1. In general, these are rapidly activating, outward-rectifier K<sup>+</sup> channels (Figure 3A). In *Shaker* K<sup>+</sup> channels. The S4 domain forms part of the voltage sensor and the P region is part of the ion-conductive pore (Doyle *et al.* 1998, Bezanilla 2000). There is no doubt at present that the S4 segment is either the or an important part of the voltage-sensing machinery in animal K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> voltage-dependent channels (for a review, see Bezanilla 2000). The elegant experiments of Starace and Bezanilla (2001) showed that four of the seven positively charged residues contained in S4 move across the entire electric field or, in other words, they

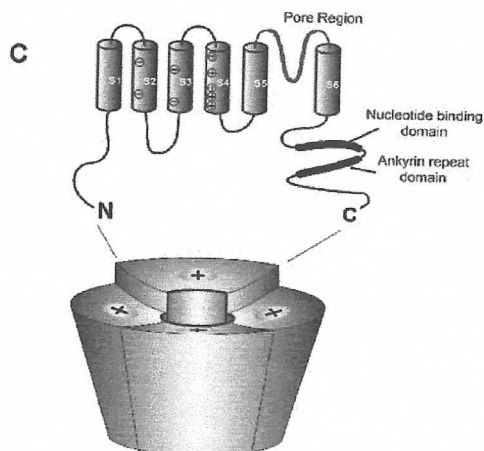
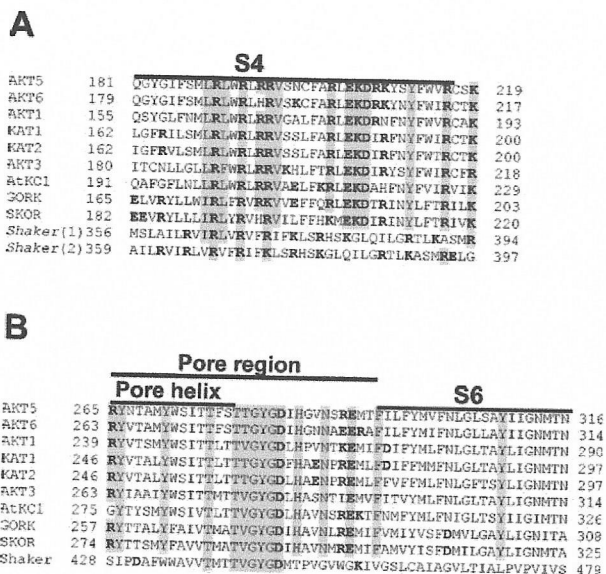


Figure 2. Primary sequence alignment of the S4 segment (A) and pore region (B) for nine plant channel  $\alpha$ -subunits in comparison with *Shaker*. Bars show the putative primary structure of S4, the pore region and S6 segments. The pore region was defined according to Doyle *et al.* (1998). Grey indicates conserved sequences. Three of the positively charged residues in the S4 segment and the signature sequence TXGYG in the P-region are conserved in all  $K^+$  channels. (C) Proposed transmembrane structure of one potassium channel subunit indicating membrane-spanning segments S1–6, the pore region (top) and the tetrameric subunit assembly to form one channel (bottom). KAT1, KAT2 and AtKC1 do not bear ankyrin repeats.

are displaced from the cytoplasmic to the external side of the membrane.

The *Shaker*  $K^+$  channel is formed by four subunits and KAT1 and AKT1 are also likely to be tetrameric structures (Figure 2C) (Cherel *et al.* 1996, Urbach *et al.* 2000). Dreyer *et al.* (1997) reported that KAT1 and AKT1, at difference from their metazoan counterparts, formed functional heteromultimers. However, Urbach *et al.*, conversely to Dreyer *et al.*'s findings, found no heteromeric KAT1/AKT1 assembly when the two polypeptides were co-expressed in insect cells. Despite these contradictory results, some  $K_{in}^+$  channel

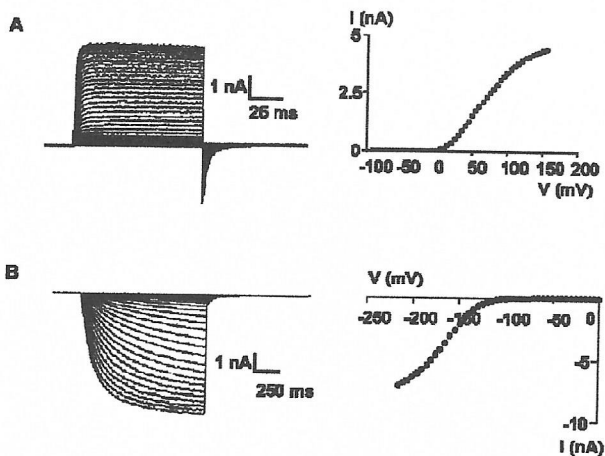


Figure 3. Time course of the macroscopic currents and current–voltage characteristics for *Shaker*  $K^+$  (A) and KAT1 channels (B). Channels were expressed in oocytes. In the case of *Shaker*, amino acids 6–46 were deleted in order to remove N-type inactivation. Data were obtained using the patch clamp technique in the cell-attached configuration. (A) Currents were elicited by voltage steps from  $-60$  to  $120$  mV in  $5$ -mV increments followed by a step to  $-60$  mV. The holding voltage was  $-100$  mV. (B) Currents were elicited by voltage steps from  $-10$  to  $-220$  mV in  $5$ -mV steps followed by a step to  $-30$  mV. Holding voltage was  $0$  mV. Currents measured in  $110$  mM symmetrical  $K^+$ .

proteins such as KAT1/KAT2 and AtKC1/AKT1 form functional channels (Pilot *et al.* 2001, Reintanz *et al.* 2002). Therefore, it is possible that plant  $K^+$  channel diversity may originate from multiple genes and formation of heteromultimeric channels by the mixing of different genes. A putative cyclic nucleotide-binding domain is present in the carboxyl terminus in both KAT1 and AKT1. In AKT1, an ankyrin domain is present downstream of the cyclic nucleotide-binding domain (Figure 2C).

Note that KAT1 has a great similitude with the *ether a-go-go (eag)* *Drosophila* channel. The *eag* channel forms part of a large class of  $K^+$  channels containing a cyclic nucleotide-binding domain (Drysdale *et al.* 1991) and which are activated by hyperpolarizing voltages. A related gene, HERG, was subsequently cloned (e.g. Warmke and Gatzky 1995) and similar to KAT1 it was also activated by hyperpolarizing voltages (Trudeau *et al.* 1995). However, the inward rectifier behaviour in HERG channels is a consequence of a very fast C-type inactivation. More closely related to KAT1 are the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels — the HCN family (Clapham 1998).

#### Nature of the voltage-dependent conductance in KAT1 channels

The molecular origin of inward rectification in plant  $K^+$  channels is still a matter of debate (e.g. Clapham 1998). The topology of KAT1 in bacterial and oocyte membranes is similar to that of *Shaker*  $K^+$  channels (Uozumi *et al.* 1988, Mura, Delgado, Bono, Cosmelli and Latorre, unpublished data). Therefore, given the similarity in the S4 region between *Shaker* and KAT1, one can postulate that in both

cases channels are open by depolarization entering after opening, into an inactivated state. According to this hypothesis, inward rectification in KAT1 (Figure 3B) is only apparent and can be linked to some type of inactivation and hyperpolarization-dependent recovery from inactivation, as is the case of HERG channels (e.g. Trudeau *et al.* 1995). This inactivation is a slow (in the second range) process, which was dubbed C-type inactivation since it was first found that mutations in the S6 segment of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel could modify it (Hoshi *et al.* 1990). Other point mutations, in particular those in the P-region, greatly slowed down channel inactivation. For example, mutation of threonine 449 to hydrophobic amino acids like valine or tyrosine (Lopez-Barneo *et al.* 1993). Marten and Hoshi (1998) have argued strongly against the possibility that the inward rectifier properties of KAT1 are simply a recovery from inactivation. They found that: (1) the KAT1 gating kinetics are utterly insensitive to changes in external [K<sup>+</sup>]; and (2) neither mutations in the N-terminus that should suppress N-type inactivation (Hoshi *et al.* 1990) nor mutations in the pore that in *Shaker* K<sup>+</sup> channels alter C-type inactivation (e.g. Lopez-Barneo *et al.* 1993) can modify the inward rectifying characteristics of KAT1 channels (also Dreyer *et al.* 1998). For the sake of completeness, Moroni *et al.* (2000) unveiled an inactivation process in KAT1 channels by substituting a threonine in position 256 by a glutamine. The mutant T256Q channel shows a marked inactivation when the current carrier ion is NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. However, no inactivation process is apparent in the wild-type channel in the presence of K<sup>+</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. For example, histidine 267 in KAT1 (Figure 2B), which is highly conserved in plant K<sup>+</sup> channels, is a residue that when it replaces threonine 449 in *Shaker* completely removed C-type inactivation in the latter channel. Replacement of histidine 267 by serine, an amino acid that accelerates C-type inactivation about 40-fold in *Shaker*, does not change channel-gating kinetics in KAT1. Although, these results discard the involvement of N- or C-type inactivation in the activation of KAT1 channels, Zei and Aldrich (1998) postulated that the channel can inactivate from closed states far from the open state (for more detail, see below). The rate of entering into this state is slow at hyperpolarizing voltages and recovery from inactivation is fast at all voltages. However, the results indicate that the open state is always directly accessed from a closed state and, therefore, inward rectifier properties of KAT1 are not a recovery from some inactivation process as proposed, for example, for HERG channels. Thus, S4 may function as the voltage sensor that couples membrane hyperpolarization with channel opening Dreyer *et al.* (1997). Marten and Hoshi (1998) mutated residues S168 and R176 to arginine and serine, respectively. In the first case, adding a positive charge to S4 increased the slope of the conductance voltage,  $G(V)$ , curve and a decrease in slope was found when the R176 was neutralized. Neutralization of charged residues of the S4 segment in the KST1 channel (R181Q) also led to a decrease in equivalent charge movement, suggesting that in this KAT1-homologue S4 was also a voltage-sensing element (Hoth *et al.* 1997). Although, changes in the slope of the  $G(V)$  curve upon changing the net charge of S4 can be interpreted as contributions of the mutated residues to the total gating

charge, other interpretations are possible. Here, the caveat is that the apparent number of gating charges is obtained from a fit to the data using a simple Boltzmann. However, it is clear that the kinetic scheme that best describes KAT1 channel activation is more complex than a two-state model used to fit the data.

Cosmelli *et al.* (2000) determined the KAT1 channel-gating characteristics using the cut-open oocyte voltage clamp technique (Tagliatella and Stefani 1992) (Figure 4). When the relative probability of opening ( $P_o^{rel} = P_o/P_o^{max}$ ) as a function of voltage is determined from tail currents measured at a constant voltage of -50 mV (Figure 4B), the  $P_o(V)$  data deviate from the behaviour expected from a simple two-state closed-open model. A good fit to the data is obtained by using a Boltzmann function raised to the fourth power with a half activation voltage of -125 mV and an equivalent gating charge,  $z$ , of 0.74 (Figure 3C) (also Hoshi 1995). These results can be interpreted by assuming the KAT1 channel as a tetrameric structure in which subunits act independently and that during channel activation about one electronic charge is displaced per subunit. These data strongly suggest that a simple two-state is inadequate to explain the gating kinetics of KAT1 channels.

The single KAT1 channel data and the observed delay in the time course of the macroscopic currents indicate the

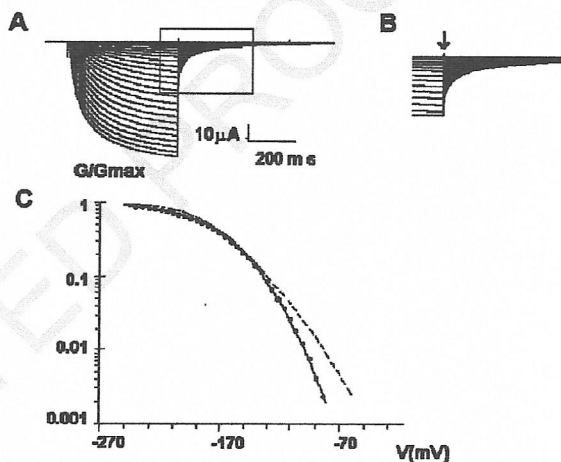


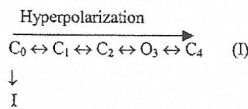
Figure 4. (A) Inward potassium currents elicited by expression of KAT1 in *Xenopus* oocytes in response to voltage pulses from a holding potential of 0 to -230 mV in 5-mV steps followed by a step to -50 mV. Currents were recorded with the cut-open oocyte voltage clamp technique. Solutions (mM) were: extracellular: 110 KMES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, pH 7.2; intracellular: 110 KMES, 10 HEPES, pH 7.2. The region indicated by the square has been augmented in (B). The arrow indicates the position of the isochronal at which the current was sampled for open probability ( $P_o$ ) analysis. (C) Logarithmic  $P_o$ -V plot. Data were fitted using a normalized Boltzmann distribution to the fourth power of the type (solid line):

$$P_o = \frac{1}{(1 + e^{(zF(V - V_{1/2})/RT)})^4}$$

where  $z$  is the apparent number of gating charges,  $V$  is the voltage,  $V_{1/2}$  is the half activation potential, and  $F$ ,  $R$  and  $T$  have their usual meanings. The best was obtained with  $z = 0.74$  and  $V_{1/2} = -125$  mV. The data were also fitted with a simple Boltzmann (broken line). The best fit was obtained with  $z = 1.14$  and  $V_{1/2} = -179$  mV.



presence of several closed states and one open state (Scheme I) (Zei and Aldrich 1998, Tang *et al.* 2000). The main characteristics of the single channel and macroscopic current are well described by the kinetic Scheme I shown below (Zei and Aldrich 1998):



where C indicates closed states, O the open state and I the inactivated state. The inactivated state that emerges from the deepest closed state was postulated based on first latency plots. Since these plots do not reach a steady-state probability of 1 (meaning that you find single channel current records with no openings; blank records), the inactivated state communicates directly with a closed state. On the other hand, the fact that blank records appear only at depolarized voltages indicates that the transition to the inactivated state takes place from a closed state far from the open state along the activation pathway. A closed state (C4) after the open state (O3) is necessary since a closed state starts being populated at large hyperpolarizing voltages. This state is visualized in the single channel current records as an increase in channel flickering as the voltage is made more negative with the consequent shortening of the mean open time.

Hoshi (1995), Zei and Aldrich (1998) and Tang *et al.* (2000) noticed that KAT1 macroscopic currents follow a sigmoidal time course as predicted by linear models with multiple closed states. If a charge  $q_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) is displaced in the transitions between closed states, the onset of the KAT1 current elicited during a hyperpolarizing pulse can be delayed by a depolarizing prepulse (Figure 5A). Therefore, the initial lag of the ionic currents reflects the early

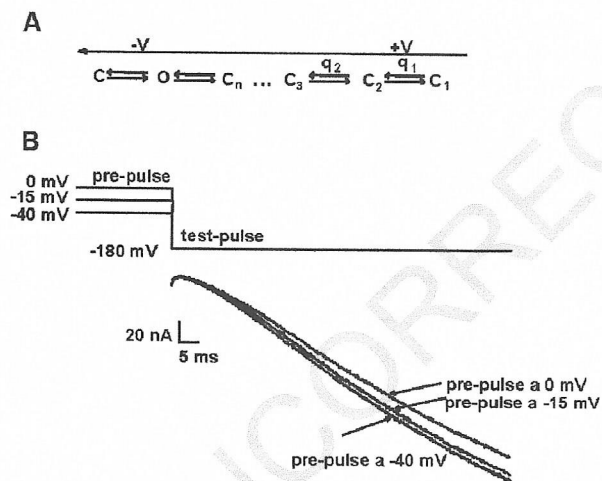


Figure 5. (A) Linear kinetic scheme that best accounts for the channel and macroscopic current data. The charge needs to be moved between closed states in order to explain the Cole–Moore shift in KAT1 channels showed in (B). In (B), the lag in the time course of the current is increased at more positive applied voltages because the closed states to the right of the scheme in (A) are more populated.

transitions of the activation pathway. Figure 5B shows that the lag increases as the depolarizing voltage pulse is increased. The simplest interpretation of this result is that the large depolarizing prepulse will populate those closed states further removed from the open state, which results in a longer lag in the activation of the ionic current, a phenomenon called a Cole–Moore Shift (Cole and Moore 1960).

Although all the evidence given above strongly suggests that in KAT1 channels the S4 domain is responsible for the voltage dependence of the activation, this hypothesis has not been tested directly. The only structural evidence at present is the work of Cao *et al.* (1995) who, using recombinant chimeric channels between KAT1 and a *Shaker*-like channel from *Xenopus*, showed that the determinants for inward rectification were located in the amino-terminal region. Two chimeric channels retained activation by hyperpolarization but not depolarization: one containing the S1–4 segments and the S4/5 linker from KAT1 and another containing the S1–5 segments from KAT1.

We have measured gating currents associated with channel activation. Gating currents were measurable only upon hyperpolarization and showed very fast kinetics (Figure 6). None of the kinetic models developed so far for the KAT1 channel can account for the time course of the gating currents shown in Figure 6 and imply the existence of more closed states connected by fast voltage-dependent rate constants (Latorre 2003). We have also investigated the state-dependent extracellular solvent exposure of the KAT1 S4 by substituting cysteines at various positions and assaying their accessibility to the membrane-impermeant thiol reagent methanethiosulfonate-ethyltrimethylammonium

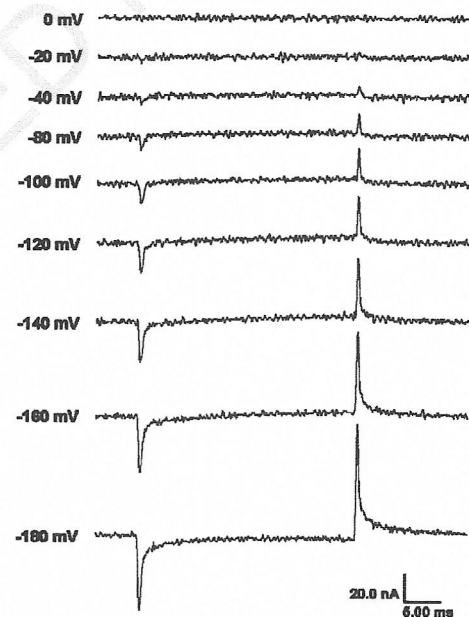


Figure 6. Family of gating current records evoked in response to 30-ms voltage pulses. Gating currents were obtained with the cut-open oocyte voltage clamp technique. Currents were measurable only upon hyperpolarizing step. The holding potential and subtracting holding potential (P/4) were 0 mV.

(MTSET). Cysteine accessibility assays reveal differential exposure to the extracellular solvent of S4 R177 residue depending of the state of the channel (Cosmelli *et al.* 2000, Latorre *et al.* 2001, Latorre 2003). When the channel is closed, cysteine 177 is readily modified by MTSET, whereas when maintained open, specific modification by the thiol reagent does not occur. That we have been able to detect charge movement associated with channel opening and that the accessibility of S4 residues is state dependent demonstrate directly that S4 is or is part of the voltage sensor in KAT1. In *Shaker* K<sup>+</sup> channels, the movement of the S4 domain during channel opening is outward. Our results indicate that in KAT1 the sensor displacements that lead to channel opening are inward. In other words, in KAT1 as in *Shaker* channels, the S4 amino acid residues involved in gating are accessible from the external side at depolarized membrane voltages. We conclude that the difference between *Shaker* and KAT1 channels must be in the coupling of the sensor to the activation gate.

### Conclusions

Roots, stomata and leaves in plants use potassium channels in order to maintain the required K<sup>+</sup> for nutrition, cell turgor and the rapid leaf movements that occur in response to day-night changes. Interestingly, potassium channels belonging to the same class of proteins, the S4 superfamily, accomplish the task of K<sup>+</sup> uptake from the soil (e.g. AKT1) and to release K<sup>+</sup> into the xylem sap (e.g. SKOR). A relevant question from the biophysical point of view is then: How is it possible that a channel with the same putative membrane topology can behave at the same time as inward (AKT1) and outward (SKOR) rectifiers? The main conclusion of this review is that in inward and outward rectifier K<sup>+</sup> channels in plants the S4 transmembrane domain behave as the voltage sensor and that the difference resides in the molecular mechanism that couples voltage sensor displacement and pore opening.

### Uncited references

Czempinski *et al.* 1997, Hoshi *et al.* 1991, Tagliatela and Stefani 1993, Uozumi *et al.* 1998, Warmke and Ganetzky 1994—PLEASE INSERT CITATIONS IN TEXT.

### Acknowledgements

The authors thank Mr Rosenmann for help with the manuscript. This work was supported by Chilean Grant Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica 100-0890 (R. L.) and Empresas CMPC. The Centro de Estudios Científicos is a Millennium Institute. The paper is based on a contribution to the XIV International Congress of Biophysics (IUPAB), 27 April–1 May 2002, Buenos Aires, Argentina.

### References

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. and Hedrich, R., 2000, GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Letters*, **486**, 93–98.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. and Gaber, R. F., 1992, Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **89**, 3736–3740.
- Berli, A., Reid, J. D., Sentenac, H. and Slayman, C., 1997, Functional comparison of plant inward rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 405–413.
- Bezanilla, F., 2000, The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiology Reviews*, **80**, 555–592.
- Cao, Y., Ward, J. M., Kelly, W. B., Ichida, A. M., Gaber, R. F., Anderson, J. A., Uozumi, N., Schroeder, J. L. and Crawford, N. M., 1995, Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **109**, 1093–1106.
- Cherel, I., Daram, P., Gaymard, F., Horeau, C., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H., 1996, Plant K<sup>+</sup> channels: structure, activity and function. *Biochemical Society Transactions*, **24**, 964–970.
- Clapham, D. E., 1998, Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron*, **21**, 5–7.
- Cole, K. S. and Moore, J. W., 1960, Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristics. *Biophysics Journal*, **1**, 161–202.
- Cosmelli, D., Rosenmann, E., Basso, C., Alvarez, O. and Latorre, R., 2000, The inward rectifier K<sup>+</sup> channel, Kat1 from *Arabidopsis thaliana* possesses an intrinsic voltage sensor. *Journal of Physiology*, **523P**, 6P–7P.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Muller-Rober, B., 1997, New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency. *EMBO Journal*, **16**, 2565–2575.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R., 1998, The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69–81.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Rober-Muller, B., Palme, K., Pongs, O. and Hedrich, R., 1997, Plant K<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit assemble indiscriminately. *Biophysics Journal*, **72**, 2143–2150.
- Dreyer, I., Becker, D., Bregante, M., Gambale, F., Lehnen, M., Palmer, K. and Hedrich, R., 1998, Single mutations strongly alter the K<sup>+</sup>-selective pore of the K<sub>in</sub> channel KAT1. *FEBS Letters*, **430**, 370–376.
- Dreyer, I., Michard, E., Lacombe, B. and Thibaud, J.-B., 2001, A plant *Shaker*-like K<sup>+</sup> channel switches between two distinct gating modes resulting in either inward-rectifying or 'leak' current. *FEBS Letters*, **505**, 223–239.
- Drysdale, R., Warmke, J. W., Kreber, R. and Ganetzky, B., 1991, Molecular characterization of eag: a gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **127**, 497–505.
- Ehrhardt, T., Zimmermann, S. and Muller-Rober, B., 1997, Association of plants K<sub>in</sub><sup>+</sup> channels is mediated by conserved c-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Letters*, **409**, 166–170.
- Epstein, E., Rains, D. W. and Elzam, O. E., 1963, Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **49**, 684–692.
- Fox, T. C. and Gueriot, M. L., 1998, Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Reviews of Plant Molecular Biology*, **49**, 669–696.
- Gaymard *et al.* 1995. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravalec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H. and Thibaud, J. B., 1996, The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes: first characterization of the AKT1 K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 22863–22870.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J. and Michaux-Ferriere, H., 1998, Identification and disruption of a *Shaker*-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell*, **94**, 647–655.
- Hille, B., 2001, *Ion Channels of Excitable Membranes* (MA: Sinauer).



- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. and Sussman, M. R., 1998, A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, **280**, 918–921.
- Hoshi, T., 1995, Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *Journal of General Physiology*, **105**, 309–328.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N. and Aldrich, R. W., 1990, Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science*, **250**, 533–538.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N. and Aldrich, R. W., 1991, Two types of inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, **7**, 547–556.
- Hoth et al. 1997. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N., 1992, Tracing the roots of ion channels. *Cell*, **69**, 715–718.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J. B., 2000, A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **6**, 837–851.
- Latorre, R. et al., 2001, *Biophysics Journal*, **80**, 436a (abst.).
- Latorre, R., 2003 (in preparation).
- Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. F. and 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.
- Maathuis, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D. and Schroeder, J. I., 1997, Roles of higher plant K<sup>+</sup> channels. *Plant Physiology*, **114**, 1141–1149.
- Marten, I. and Hoshi, T., 1998, The N-terminus of the K channel KAT1 control its voltage-dependent gating by altering the membrane field. *Biophysics Journal*, **74**, 2953–2962.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. A., Hoshi, T. and Hedrich, R., 1999, AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 7581–7586.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J., Ward, J., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I., Amtmann, A., Maathuis, F., Sanders, D., Harper, J., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M., Salt, D., Kim, S. and Gueriot, M., 2001, Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 1646–1667.
- Moroni, A., Gazzarrini, S., Cerana, R., Colombo, R., Sutter, J.-U., DiFrancesco, D., Gradmann, D. and Thiel, G., 2000, Mutation in pore domain uncovers cation- and voltage-sensitive recovery from inactivation in KAT1 channel. *Biophysics Journal*, **78**, 1862–1871.
- Mouline, K., Very, A. A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J. B. and Sentenac, H., 2002, Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a *Shaker* K(+) channel in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, **3**, 339–350.
- Muller-Rober, B., Ellenberg, J., Provart, N., Willmitzer, L., Busch, H., Becker, D., Dietrich, P., Hoth, S. and Hedrich, R., 1995, Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K<sup>+</sup> channel expressed in potato guard cells. *EMBO Journal*, **14**, 2409–2416.
- Nakamura, R. L., McKendree, W. L., Hirsch, R. E., Sedbrook, J. C., Gaber, R. F. and Sissman, M. R., 1995, Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology*, **109**, 371–374.
- Philippar, K., Fuchs, I., Lüthen, H., Hoth, S., Bauer, C. S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Böttger, M., Becker, D. and Hedrich, R., 1999, Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 12186–12191.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H., 2001, Guard cell inward K<sup>+</sup> channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 3215–3221.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. and Hedrich, R., 2002, AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel-subunit modulates root hair K<sup>+</sup> influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **99**, 4079–4084.
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. and Gaber, R. F., 1992, Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science*, **258**, 1654–1658.
- Schroeder, J. I., Ward, J. M. and Gassman, W., 1994, Perspectives on the physiology and structure of inward rectifying K<sup>+</sup> channels in higher plants: biophysical implications for K<sup>+</sup> uptake. *Annual Reviews in Biomolecular Structures*, **23**, 441–471.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M., Gaymard, F. and Grignon, C., 1992, Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transporting system. *Science*, **256**, 663–665.
- Slayman, C. L., 1987, The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton pumping electroenzyme. *Journal of Bioener. Biomembr.*, **19**, 1–20.
- Starace and Bezanilla 2001. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Szabó, I., Negro, A., Downey, P. M., Zoratti, M., Lo Schiavo, F. and Giacometti, G. M., 2000, Temperature-dependent functional expression of a plant K<sup>+</sup> channel in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**, 130–135.
- Szyroki et al. 2001. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Tagliatalata and Stefani 1992. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Tagliatalata, M. and Stefani, E., 1993, Gating currents of the cloned delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel DRK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **90**, 4758–4762.
- Tang et al. 2000. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y.-N. and Jan, L. Y., 1987, Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science*, **237**, 770–775.
- Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. and Robertson, G., 1995, HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science*, **269**, 92–95.
- Uozomi et al. 1988. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Uozomi, N., Nakamura, T., Schroeder, J. I. and Muto, S., 1998, Determination of the transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **95**, 9773–9778.
- Urbach, S., Chérel, I., Sentenac, H. and Gaymard, F., 2000, Biochemical characterization of the *Arabidopsis* K<sup>+</sup> channels KAT1 and AKT1 expressed or co-expressed in insect cells. *Plant Journal*, **4**, 527–538.
- Véry, A. A., Gaymard, F., Bosseaux, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B., 1995, Expression of a cloned plant K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant Journal*, **2**, 321–332.
- Warmke, J. W. and Ganetzky, B., 1994, A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **91**, 3438–3442.
- Warmke and Ganetzky 1995. PLEASE SUPPLY COMPLETE REFERENCE.
- Zeigler, P. C. and Aldrich, R. W., 1998, Voltage-dependent gating of single wild-type and S4 mutant KAT1 inward rectifier potassium channels. *Journal of General Physiology*, **12**, 679–713.
- Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G. and Müller-Rober, B., 1998, Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology*, **3**, 879–890.

Received 11 July 2002, and in revised form 12 October 2002.

# Modulation of the *Shaker* K<sup>+</sup> Channel Gating Kinetics by the S3-S4 Linker

CARLOS GONZALEZ,<sup>\*‡</sup> EDUARDO ROSENMAN,<sup>\*‡</sup> FRANCISCO BEZANILLA,<sup>§¶</sup> OSVALDO ALVAREZ,<sup>\*‡</sup>  
and RAMON LATORRE<sup>\*‡¶</sup>

From the <sup>\*</sup>Centro de Estudios Científicos de Santiago, Presidente Errazuriz 3132, Santiago, 6760470 Chile; <sup>†</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, 6850240 Chile; and the <sup>‡</sup>Department of Physiology and <sup>§</sup>Department of Anesthesiology, University of California, Los Angeles, School of Medicine, Los Angeles, California 90095

**ABSTRACT** In *Shaker* K<sup>+</sup> channels depolarization displaces outwardly the positively charged residues of the S4 segment. The amount of this displacement is unknown, but large movements of the S4 segment should be constrained by the length and flexibility of the S3-S4 linker. To investigate the role of the S3-S4 linker in the *Shaker*H4Δ(6-46) (*Shaker*Δ) K<sup>+</sup> channel activation, we constructed S3-S4 linker deletion mutants. Using macro-patches of *Xenopus* oocytes, we tested three constructs: a deletion mutant with no linker (0 aa linker), a mutant containing a linker 5 amino acids in length, and a 10 amino acid linker mutant. Each of the three mutants tested yielded robust K<sup>+</sup> currents. The half-activation voltage was shifted to the right along the voltage axis, and the shift was +45 mV in the case of the 0 aa linker channel. In the 0 aa linker, mutant deactivation kinetics were sixfold slower than in *Shaker*Δ. The apparent number of gating charges was  $12.6 \pm 0.6 e_0$  in *Shaker*Δ,  $12.7 \pm 0.5$  in 10 aa linker, and  $12.3 \pm 0.9$  in 5 aa linker channels, but it was only  $5.6 \pm 0.3 e_0$  in the 0 aa linker mutant channel. The maximum probability of opening ( $P_o^{\max}$ ) as measured using noise analysis was not altered by the linker deletions. Activation kinetics were most affected by linker deletions: at 0 mV, the 5 and 0 aa linker channels' activation time constants were 89× and 45× slower than that of the *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channel, respectively. The initial lag of ionic currents when the prepulse was varied from -130 to -60 mV was 0.5, 14, and 2 ms for the 10, 5, and 0 aa linker mutant channels, respectively. These results suggest that: (a) the S4 segment moves only a short distance during activation since an S3-S4 linker consisting of only 5 amino acid residues allows for the total charge displacement to occur, and (b) the length of the S3-S4 linker plays an important role in setting *Shaker*Δ channel activation and deactivation kinetics.

**KEY WORDS:** *Shaker* K<sup>+</sup> channel • S3-S4 linker • S4 displacement

## INTRODUCTION

The opening of *Shaker* K<sup>+</sup> channels is associated with the displacement of ~13 electron charge units (Schoppa et al., 1992) or ~3.3  $e_0$  per subunit since the channel is a tetramer (MacKinnon, 1991; Liman et al., 1992). In voltage-dependent K<sup>+</sup> channels, several studies indicate that most of these charges are confined to the fourth transmembrane domain (S4) of the channel protein (Aggarwal and MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). The S4 segment contains several highly conserved positively charged amino acids. In *Shaker* K<sup>+</sup> channels, at least four of these residues contribute to the voltage sensitivity of the channel and to the gating currents: arginines 362, 365, 368, and 371. Transmembrane displacements of the S4 domain were detected in K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels using cysteines substituting residues in S4 (Larsson et al., 1996; Yusaf et al., 1996; Yang and Horn, 1995; Yang et al., 1996). These studies showed that the accessibility of these amino acid residues changes as the channel undergoes transitions be-

tween closed, open, and inactivated states. Moreover, when attached to specific sites near the S4 segment of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel, the fluorescence probe tetramethylrhodamine maleimide undergoes voltage-dependent changes in intensity that correlate with the movement of the voltage sensor (Mannuzzu et al., 1996; Cha and Bezanilla, 1997). More recently, Starace et al. (1997) and Starace and Bezanilla (1998, 1999) showed that when arginines 362, 365, 368, and 371 are replaced by histidines, they move from the internal to the external aqueous environment of the channel during activation resulting in passive proton transport across the membrane. These experiments support the idea of the presence of narrow vestibules that line the S4 segment, allowing the passage of protons but excluding the larger cysteine reactive reagents (compare Larsson et al., 1996).

All the evidence given above points to the fact that the S4 transmembrane domain is an important part of the voltage sensor and that this domain of the protein moves in the electric field when the channel is activated by voltage. According to some models, the S4 segment moves during channel activation across the membrane as a sliding helix (Durell and Guy, 1992; Catter-

Address correspondence to Dr. F. Bezanilla, Dept. of Physiology, UCLA School of Medicine, 10833 Le Conte Avenue, Los Angeles, CA 90095. Fax: 310-794-9612; E-mail: fbezanil@ucla.edu

all, 1996). In this model, the helical screw movement is perpendicular to the lipid bilayer. Therefore, the displacement of the S4 segment that involves transfer of at least 10 amino acid residues (362–371) across the membrane is on the order of 1.5 nm. With such a large movement, the S4 segment displacement should be constrained by the length of the S3–S4 linker. On the other hand, several investigators have proposed that the electric field can be focused in a region of the membrane much narrower than the bilayer thickness. If this is the case, only small conformational changes of the voltage sensor would be necessary to translocate the gating charges through the entire electric field (Larsson et al., 1996; Seoh et al., 1996; Yang et al., 1996; Papazian and Bezanilla, 1997). In this case, the length of the S3–S4 linker would not be critical for the sensor operation. One study that can shed some light about the actual extent of the displacement of the S4 segment is to measure the gating properties of *Shaker* K<sup>+</sup> channel mutants with an S3–S4 linker of different lengths.

The role of the S3–S4 linker in *Shaker* K<sup>+</sup> channel activation was previously studied by Mathur et al. (1997). They defined the S3–S4 linker as the 25 amino acid segment comprised between glutamate 333 and serine 357 and found that changes in charge and length of the S3–S4 linker produced only minor effects in the voltage dependence of activation. In the present study, we have used the alignment of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels done by Wallner et al. (1996) and redefined the S3–S4 linker to be the segment comprised of amino acid residues valine 330 to isoleucine 360 (Fig. 1). According to this new definition, the S3–S4 linker is a 31 amino acid (aa)<sup>1</sup> segment. To study the role of this segment in *Shaker* K<sup>+</sup> channel activation, we have characterized in detail three deletion mutants: one in which the linker was completely deleted (0 aa), a second one in which 5 amino acid residues from the carboxy terminus were left (5 aa linker), and a mutant in which the S3–S4 linker contains 10 noncontiguous amino acid residues (10 aa linker) (Fig. 1).

We found that after complete deletion of the S3–S4 linker, fully functional channels are expressed, although the details of channel voltage-dependent activation are different from that of the wild type. We conclude that the S4 segment needs to move only a short distance to signal the ion pathway to open.

## MATERIALS AND METHODS

### Mutations and Channel Expression

Constructs were prepared on *ShakerH4Δ*(6-46) (*ShakerH4Δ*). The deletion of amino acid residues from 6 to 46 removes N-type inactivation. The *ShakerH4Δ* K<sup>+</sup> channel cDNA was originally cloned into an engineered version of the pBSTA vector. The S3–

S4 deletion mutants were *ShakerH4Δ* Δ(330-360), dubbed here 0 aa linker, *ShakerH4Δ* Δ(330-355) (5 aa linker), and *ShakerH4Δ* Δ(332-351) (10 aa linker), and were prepared by PCR-based mutagenesis (Expand Hi Fidelity PCR system; Boehringer Mannheim, or Pfu DNA polymerase; Stratagene). The S3–S4 linker was defined as the segment comprised of residues 330–360 (Fig. 1; Wallner et al., 1996). Primers (Oligopéptido; Santiago7) were designed to give a product containing the complete cDNA sequence except for the deleted sequence described above. The PCR products were purified by agarose gel electrophoresis, phosphorylated using T4 polynucleotide kinase (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) and ligated using T4 DNA ligase (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.).

Competent *Escherichia Coli* cells, DH5 or XLI Blue, were transformed with the ligation products. Colonies obtained after transformation were selected using HaeII (one cut at the S3–S4 linker). cDNAs from preselected colonies were sequenced using T7 Sequenase version 2.0 (Amersham) to choose those having the expected sequence. The ~400-bp cassettes containing the mutations were cut out using the restriction enzymes XbaI and BsmI and were subcloned in the vector pBSTA with the original *ShakerH4Δ* DNA insert. The mutated cDNAs were transcribed in vitro using T7 RNA polymerase (mMessage Machine; Ambion). Transcription was done at 37°C in a volume of 10 μl, following the manufacturer's instructions. The cRNA products were extracted with ethanol, and suspended in double distilled water to a final concentration of 1 μg/μl.

Translation of the cRNA's was done in *Xenopus laevis* oocytes. *Xenopus* were purchased from Nasco International, Inc. The protocol used to isolate *Xenopus laevis* oocytes received institutional approval and followed National Institutes of Health guidelines. Oocytes from *Xenopus laevis* were defolliculated by incubation with 2.5 mg/ml collagenase in filtered OR-2 medium. Oocytes were well separated after shaking 1–2 h on a clinical rotator at room temperature at 180 rpm (ROT-2; P+L Electrónica). Collagenase was removed by washing the separated oocytes five times with OR-2 medium containing (mM): 82.5 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH 7.6, and five times with ND-96 medium containing (mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 500 mg/ml gentamicin, 5 HEPES, pH 7.6. Collagenase was from GIBCO BRL Life Technologies, Inc. Stage V and VI oocytes were selected and maintained in ND-96 medium at 18°C for 12–24 h before RNA injection. 50 nl of cRNA solution (0.1–0.2 μg/μl) was injected into either the vegetal or the animal poles of each oocyte using micropipettes (4878; World Precision Instruments) of 20 μm tip diameter attached to a microinjector (A203XVY; World Precision Instruments).

### Electrophysiology

2–5 d after cRNA injection and after the manual removal of the vitelline membrane, currents elicited by the different mutants were recorded in cell-attached macropatches of oocyte membrane. Patch pipettes of 10–30 μm in diameter were pulled from melting point tubes (9530-1; Corning Glass Works) and had a resistance of ~1 MΩ. No series resistance compensation was used and the error due to uncompensated series resistance was never greater than 5 mV. Bath and pipette solutions contained (mM): 110 KMES, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2. The acquisition and basic analysis of the data were performed with pClamp 6.0 software (Axon Instruments, Inc.) driving a 12-bit analogue interface card (Labmaster DMA; Scientific Solutions, Inc.).

### Macroscopic Current Analysis

For macroscopic current relaxation experiments, the membrane was held at –100 mV. Each experimental episode consisted of an epoch at the holding potential, followed by a depolarization to

<sup>1</sup>Abbreviations used in this paper: aa, amino acid; WT, wild type.



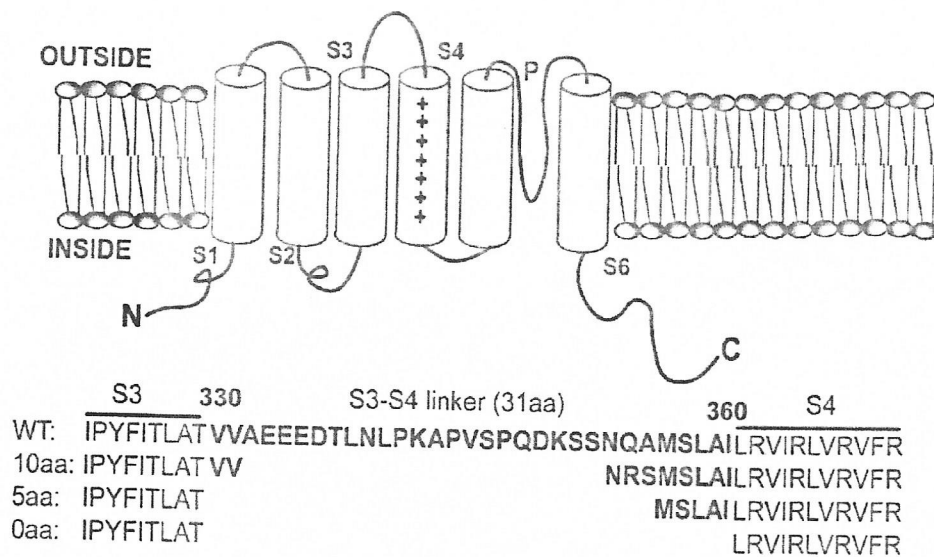


FIGURE 1. Mutations of the *Shaker* S3-S4 linker region. The wild-type *Shaker* sequence (top) is compared with the mutations studied here. The S3-S4 linker was defined according to Wallner et al. (1996). The asparagine-arginine-serine sequence in the 10 aa linker channel corresponds to the S3-S4 linker region present in the human calcium-activated  $K^+$  channel (h*Slo*; Wallner et al., 1996).

different test voltages and ending with an epoch at  $-60$  mV. The episode duration ranged from 140 to 1,400 ms, depending on the relaxation times of the various mutant channels. Each experiment consisted of 10-50 episodes separated by 1-2 s. The test pulse was incremented by 3-10 mV on each subsequent episode. For each episode, 512 digital samples of current were acquired at equally spaced times. The analogue signal was filtered before digitization with an eight-pole low-pass Bessel filter with a cutoff frequency of 1/5 of the conversion frequency. Conductance-voltage relations were determined from the peak amplitude of the tail currents after repolarization to a fixed negative voltage.

#### Cole-Moore Analysis

Families of currents from the WT *Shaker* $\Delta$  and linker mutant channels were obtained as follows: 100-ms-long prepulses to voltages between  $-130$  and  $-40$  mV preceded pulses to  $+50$  mV. Each current record obtained during the 50-mV pulse was compared with the current record measured after the  $-130$  mV prepulse. Records were displaced along the time axis and the differences were evaluated visually. The time displacement giving the best superposition of the traces was taken as the Cole-Moore shift.

#### Time Constants Calculation

A quantitative comparison of the activation kinetics was obtained from monoexponential fits of the upper 50% of the rising phase of the current. The mathematical expression used for the fit of the time course of channel activation was:

$$I(t) = 0 \text{ (for } \tau < d) \\ I(t) = I_{\max} \{1 - \exp[-(t-d)/\tau_a]\} \text{ (for } t > d), \quad (1)$$

where  $d$  is the delay and  $t$  the time constant of the exponential. This simplified approach has been demonstrated to be efficient for assessing rate constants in multistep ramified activation pathways (Schoppa and Sigworth 1998a). For large depolarizations, where the backward rate constants are negligible, the parameter  $\tau_a$  is a measure of the reciprocal value of the slowest rate constant in the activation path and  $d$  is a measure of the addition of the reciprocal values of all the rest of the constants.

Deactivation kinetics were obtained by fitting the early decay of the tail current to a sum of two monoexponential decays, leav-

ing out the first 0.1 ms of the test pulse to allow for clamp settling. The fastest time constant of the decay of the tail currents was used as an estimation of the rate constant of closing (deactivation) of channels.

#### Variance Analysis

A series of identical records were recorded pulsing to a positive voltage from the holding potential. Pairs of  $M$  subsequent records  $X_i(t)$ ,  $X_{i+1}(t)$  were subtracted to compute the experimental nonstationary ensemble variance. The average basal variance at the holding voltage was subtracted from the variance obtained during the test pulse. The subtracted variance ( $\sigma^2$ ) was plotted versus mean current [ $I(t)$ ] and the data was fitted using (Sigworth, 1980):

$$\sigma^2 = iI(t) - I(t)^2/N, \quad (2)$$

where  $i$  is the single channel current amplitude and  $N$  the number of channels.  $i$  was obtained from the initial slope,  $N$  was obtained from the nonlinear curve fitting analysis done under Microsoft Excel. The maximum open probability,  $P_o^{\max}$  was obtained according to the relation:  $P_o^{\max} = I_{\max}/iN$  where  $I_{\max}$  is the maximum mean current measured in the experiment.

#### Limiting Slope Analysis

The method developed by Almers (1978) gives the number of effective gating charges coupled to the channel opening in a sequential model with any number of closed states and only one open state. However, the method is also valid for any nonsequential or sequential model having one or more than one open state as long as the transitions between open states are voltage independent (Sigg and Bezanilla, 1997). The ionic current recorded during a voltage ramp was subtracted off line from the linear leakage and subsequently converted into conductance by dividing the ionic current by its driving force. The G-V plot was fitted to a monoexponential approximation in the limit of very negative voltages:

$$G(V) = A \exp(z\delta FV/RT), \quad (3)$$

where  $z$  is the number of effective charges per channel. The  $z\delta$  value was also obtained from the relationship:

$$z\delta(V) = (kT/e_0) d \ln G(V) / dV. \quad (4)$$

As pointed out by Zagotta et al. (1994a), a plot of  $z\delta$  as a function of voltage (or  $P_o$ ) is a good test of having reached the true limiting slope. In this plot, at very negative voltages,  $z\delta$  will asymptotically approach a saturating value that is equal to the total number of charges per channel.

In the text, errors in all measured quantities are given as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS

### *Deletions at the Amino-Terminal End of the S3-S4 Linker Slow Down the Rates of Channel Activation and Deactivation*

Fig. 2 shows ionic currents elicited by various depolarizing voltages from a holding voltage of  $-100$  mV followed by a postpulse to  $-60$  mV for the *Shaker* $\Delta$  "wild type" (WT) (Fig. 2 A) channel. Ionic currents records for the 10, 5, and 0 aa S3-S4 linker channel mutants are shown in Fig. 2, B, C, and D, respectively. Robust  $K^+$  currents from each deletion mutant 1 or 2 d after the cRNA injection implied that none of the mutations in the S3-S4 linker affected the synthesis and assembly of the functional *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channels in oocyte membranes. Complete (0 aa linker) or partial (5 aa linker) removal of the linker profoundly affected the rates of channel activation. The 10 aa linker mutant has biophysical properties very similar to those of the WT channels. Both activation and deactivation kinetics were slowed down in the 0 aa linker channel compared with the wild-type channel (Fig. 2 D). In Fig. 2 D, we can clearly see that in the 0 aa linker mutant the tail currents become very slow. The same phenomenon was observed in the case of the 5 aa linker mutant. However, in this case, the effect of the deletion is mainly on the activation kinetics. The time course of the ionic current in this case is very slow and at intermediate depolarizations the current increases only after a long time delay. This initial lag of ionic currents is also present in the 0 aa, but is particularly pronounced in the 5 aa linker mutant (Fig. 1 C; see also Fig. 4).

### *Deletions in the S3-S4 Linker Shift the Voltage-Activation Curve*

Information about the mutant and WT channels' behavior under equilibrium conditions was obtained from conductance versus voltage curves. Conductance versus voltage curves for the WT and mutant channels were obtained by directly plotting the peak tail current amplitude at a constant postpulse potential ( $-60$  mV) and as a function of the test prepulse potential in high external  $K^+$ . Notice that, at large depolarizations, the tail current saturates (e.g., Fig. 2 D), indicating that the

maximum channel open probability ( $P_o^{\max}$ ) has been reached since the current at the peak of the tail [ $I_{\text{tail}}(V)$ ] determined with a test prepulse  $V$  is (Eq. 5):

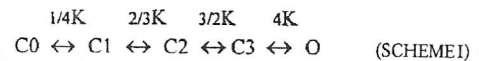
$$I_{\text{tail}}(V) = NiP_o(V), \quad (5)$$

where  $i$  is the current amplitude of the single channel,  $N$  the number of channels, and  $P_o(V)$  the voltage-dependent open probability. Therefore,  $I_{\text{tail}}(V)/I_{\text{tail}}^{\max}(V) = P_o(V)/P_o^{\max}$ , where  $I_{\text{tail}}^{\max}$  is the maximum amplitude reached by the tail currents (Stefani et al., 1994; Zagotta et al., 1994b).

Fig. 3 shows the relationships  $P_o(V)/P_o^{\max}$ -prepulse voltage for the WT and mutant channels. Zagotta et al. (1994b) fit the conductance-voltage curves with a function of the type:

$$P_o(V)/P_o^{\max} = \{1/[1 + K \exp(-z\delta FV)/RT]\}^n, \quad (6)$$

with  $n$  equal to 1 or 4, where  $K \exp(-z\delta FV)/RT$  represents the voltage-dependent equilibrium constant for each independent transition. In this case, the voltage-dependent activation mechanism involves  $n$  independent conformational changes before opening. The fit to the  $P_o(V)/P_o^{\max}$ -voltage curves using Eq. 6 is poor for the WT channel (Fig. 3 A, broken line) and is clearly inadequate for the 10 aa linker channel (Fig. 3 B, broken line). In particular, the fit to the  $P_o(V)/P_o^{\max}$  data, Eq. 6 misses all data points at relative open probabilities  $>0.8$ . However, the fit to the  $P_o(V)/P_o^{\max}$  data using Eq. 6 is good for the 5 and 0 aa linker mutants (Fig. 3, C and D; Table I). Eq. 6 is based in a model that requires only a single conformational change in each subunit to open the channel (Hodgkin and Huxley, 1952).



Where C0 to C3 represent closed conformations after zero to three independent transitions, respectively, O represents the open conformation,  $K = K(0) \exp(-z\delta_1 FV/RT)$  is the voltage-dependent equilibrium constant, and  $K(0)$  is the equilibrium constant at zero voltage for each transition. Scheme I corresponds to class A of models in Zagotta et al. (1994b) or 1 + 0 (each subunit undergoing one transition) in Schoppa and Sigworth (1998b) that can be summarized as  $(R \leftrightarrow A)_4 - O$ , where each subunit can be either in a resting (R) or an active (A) conformation; we defined  $K = R/A$ .

We found that the fit to the  $P_o(V)/P_o^{\max}$  data improves notably for the wild type and the 10 aa linker mutant (Fig. 3, A and B, solid lines) using a model in which the four independent and identical voltage-dependent transitions are followed by a final concerted



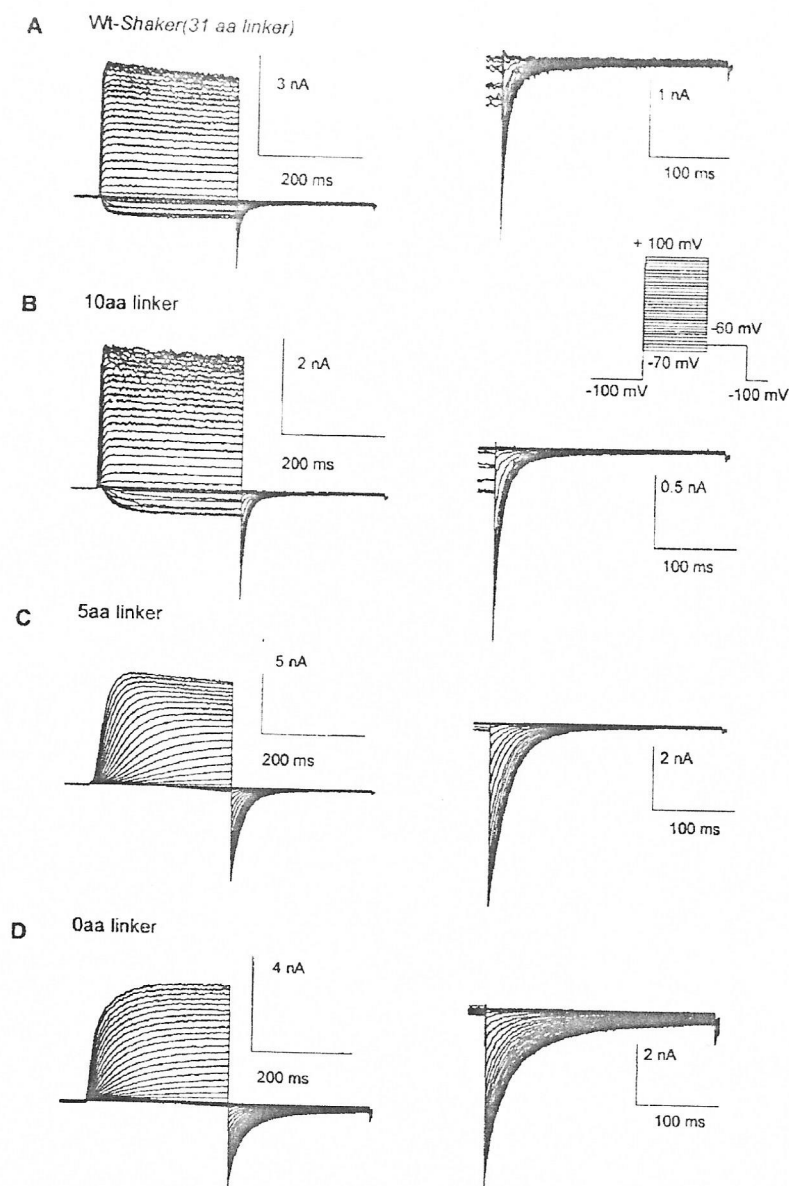
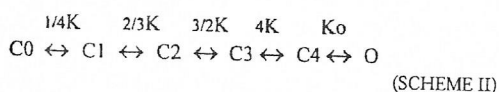


FIGURE 2. Deletions in the S3-S4 linker slow down activation and deactivation kinetics in *Shaker* $\Delta$ . Macroscopic currents for *Shaker* $\Delta$  (A), and 10 (B), 5 (C), and 0 (D) aa S3-S4 linker mutants. Currents were recorded from cell-attached macropatches from oocytes expressing the different channels. Currents were elicited by voltage steps from -60 to 120 mV in 5-mV increments, followed by a step to -60 mV. The holding voltage was -100 mV.

transition that lead to the open state (Koren et al., 1990; Zagotta and Aldrich, 1990) (Scheme II).



Where  $K_0$  represents the equilibrium constant for the concerted transition. Scheme II can be summarized as  $(R \leftrightarrow A)_4 \leftrightarrow O$ . It is important to note here that, to fit the data for  $P_o(V)/P_o^{\max}$  0.8, the concerted transition must be voltage-dependent; i.e.,  $K_0 = K_0(0)\exp(-\delta_2 FV/RT)$  (Table I). Recently, Ledwell and Aldrich (1999) were able to isolate the final cooperative step by taking advantage of the *Shaker* channel mutant V369I, I372L, S376T.

Their results showed that the last step is voltage dependent and that the charge movement associated with the final gating transition accounts for 13% of the total charge displaced in the activation pathway.

For Scheme II, the probability of opening is given by the relation:

$$\frac{P_o(V)}{P_o^{\max}} = (1 + K_0 + 4K_0K + 6K_0K^2 + 4K_0K^3 + K_0K^4)^{-1} \quad (7)$$

The total gating charge per channel determines the slope at very low open probabilities (e.g., Almers, 1978; Sigg and Bezanilla, 1997; see below). However, the shape and slope of the  $P_o(V)/P_o^{\max}$ -V curves at higher open probabilities are additionally influenced by inter-

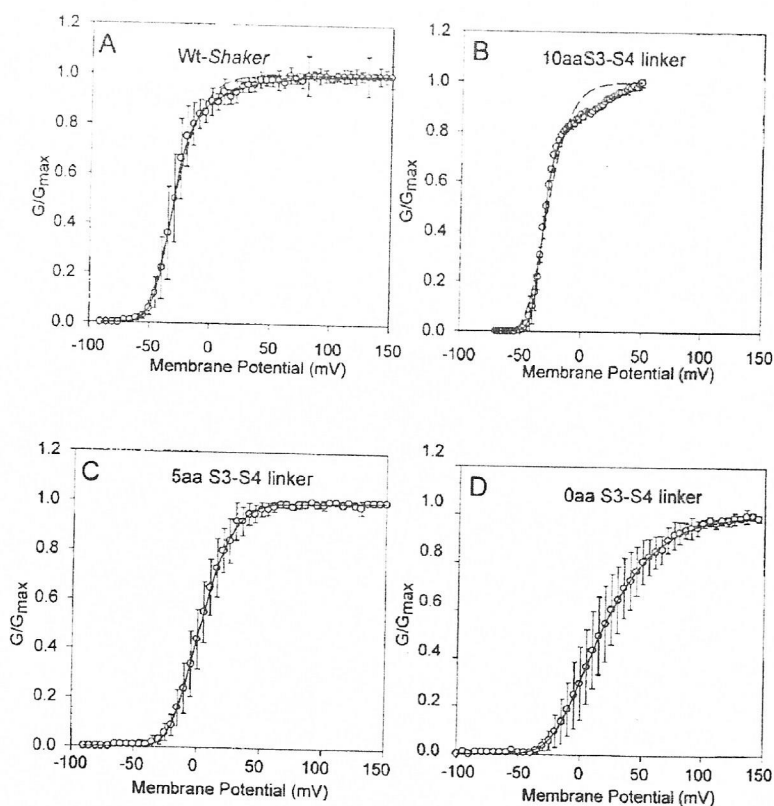


FIGURE 3. Deletions in the S3-S4 linker shift the G-V curves toward depolarizing voltages. Voltage dependence of activation of wild-type *Shaker* $\Delta$  and S3-S4 linker mutants. The conductance-voltage curves were obtained using tail current measurements. Each point is the average of determinations on 10-20 separate patches. Solid lines were drawn using parameters in Table I and Eq. 7 for the WT and 10 aa linker mutant, or Eq. 6 for the 5 and 0 aa linker mutants. Dashed lines drawn for the WT and 10 aa linker mutant are the best fit to a fourth power Boltzmann function.

actions between subunits (Zagotta et al., 1994a; Smith-Maxwell et al., 1998).

In the case of the 10 aa linker mutant, since the charge residues in the S4 segment were not modified, the increase in the slope (Table I) can be due to an increase in positive cooperativity between subunits. The change in slope cannot be due to an increase in the number of gating charges per channel since the limiting slope in this mutant is not different from that of the WT *Shaker* $\Delta$  channel (see below).

Why can the 5 and 0 aa linker mutants be described using a fourth power of a Boltzmann function? One possible explanation is to consider that the equilibrium

$R \leftrightarrow A$  is displaced to the left in an amount such that the last concerted transition is heavily biased to the open state at those voltages that are able to displace the  $R \leftrightarrow A$  to the right (all subunits in their active configuration). In other words, if we assume that linker mutations do not affect the last transition, stabilization of the subunits in the R configuration brings as a consequence that the  $P_o(V)/P_o^{max}$  curves apparently behave according to Scheme I.

#### Voltage Dependence of the Activation and Deactivation Kinetics

The voltage dependence of the activation kinetics in the wild type and mutant channels was characterized by fitting the upper half of the current record to a single exponential (Fig. 4, inset) and a delay.

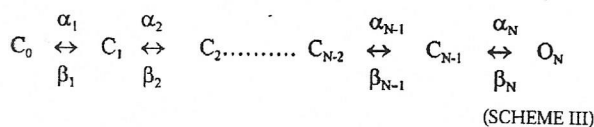
We fit the ionic currents obtained at depolarized voltages, where it is safe to assume that  $\beta_1 = 0$ , using Eq. 1. The activation time constant,  $\tau_a = \alpha_j^{-1}$  where  $\alpha_j^{-1}$  is the limiting rate in Scheme III and the delay,  $d = \sum \alpha_i^{-1}$  ( $i \neq j$  to  $n$ ). This approach is likely to be valid for branched models (Schoppa and Sigworth, 1998a).

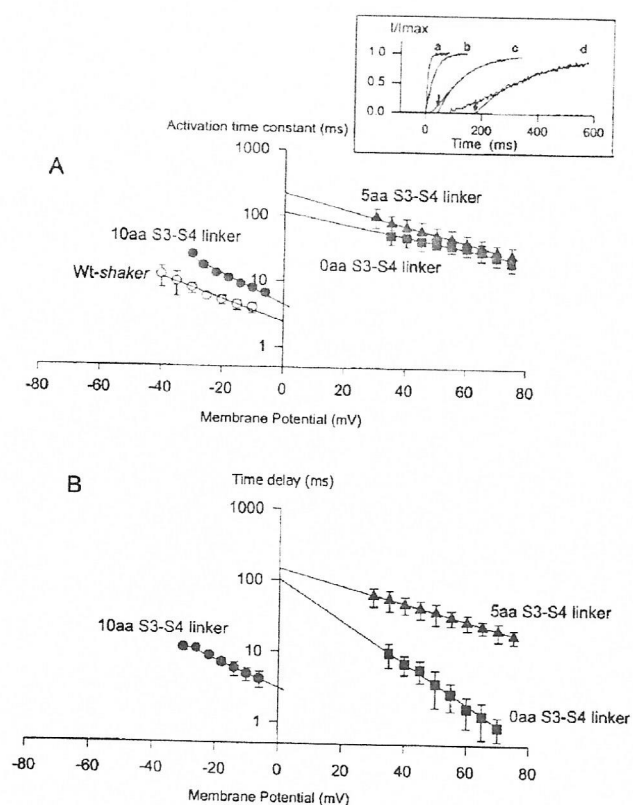
TABLE I

Parameters Used to Fit the Relative Open Probabilities-Voltage Curves

| Parameters  | WT   | 10 aa S3-S4 linker | 5 aa S3-S4 linker | 0 aa S3-S4 linker |
|-------------|------|--------------------|-------------------|-------------------|
| K(0)        | 0.05 | 0.004              | 0.22              | 0.35              |
| $z\delta_1$ | 1.76 | 2.7                | 1.65              | 0.93              |
| Ko(0)       | 0.10 | 0.12               | —                 | —                 |
| $z\delta_2$ | 0.72 | 0.60               | —                 | —                 |
| n           | 20   | 20                 | 10                | 10                |

Curves for the WT and the 10 aa linker channel were fit to Eq. 7 by least squares within the Microsoft Excel data analysis program, leaving K,  $z\delta_1$ , Ko, and  $z\delta_2$  as adjustable parameters.  $K = K(0)\exp(-z\delta_1F/RT)$  and  $Ko = Ko(0)\exp(-z\delta_2F/RT)$ . For the 5 and 0 aa linker channels, data were fit to Eq. (6). n is the number of experiments.





**FIGURE 4.** Activation kinetics become slower by deletions in the S3-S4 linker. (A) Channel activation was characterized by a fit of the time course of the current elicited by depolarization from a holding potential of  $-100$  mV to an exponential function with a time constant  $\tau_a$  and a time delay  $d$  (Eq. 1). Arrows in the inset show  $d$  for the 5 and 0 aa linker mutants. The fit started near the time at which current had reached  $\sim 30$ –50% of the maximum (see inset). Arrows in the inset show  $d$  for the 5 and 0 aa linker mutants. The solid lines are fits to the data using an equation of the form:  $\tau_a = A \exp(-ZV/RT)$ , where  $\tau_a$  is the activation time constant,  $A$  is a constant,  $Z$  defines the voltage dependence of  $\tau_a$ , and  $V$  is the voltage. Parameters  $A$  were  $2.45 \pm 0.74$ ,  $4.45 \pm 0.25$ ,  $217 \pm 65$ , and  $111 \pm 22$  ms for the WT, and 10, 5, and 0 aa linker mutants, respectively. Parameters  $Z$  were  $0.95 \pm 0.35$ ,  $1.30 \pm 0.03$ ,  $0.71 \pm 0.08$ , and  $0.53 \pm 0.04$  for the WT, and 10, 5, and 0 aa linker mutants, respectively. (B) Plots of the time delay  $d$  as a function of voltage. Lines were drawn using an equation of the form:  $d = A \exp(-ZV/RT)$ . Parameters  $A$  were  $3.1 \pm 1.1$ ,  $146 \pm 53$ , and  $103 \pm 48$  ms for the 10, 5, and 0 aa linker mutants, respectively. Parameters  $Z$  were  $1.11 \pm 0.10$ ,  $0.70 \pm 0.05$ , and  $1.68 \pm 0.06$  for the 10, 5, and 0 aa linker mutants, respectively.

In the case of the 10 aa linker mutant,  $\tau_a$  at 0 mV was twofold slower than that of the WT channel. It also produced a 10-mV shift of the  $\tau_a$  versus voltage curve to the right along the voltage axis (Fig. 4 A, ●). The 0 aa linker mutant resulted in a 45-fold slowing of  $\tau_a$  at 0 mV compared with the WT channel and a positive shift of the  $\tau_a$  versus voltage (Fig. 4 A, ■). On the other hand, the 5 aa linker mutant produced an 89-fold slowing down of activation at 0 mV (Fig. 4 A, ▲). From the slopes of the solid lines in Fig. 4 A, we calculated the

number of apparent gating charges,  $z_a$ , displaced in the rate limiting transition.  $z_a$  was 1.01, 1.27, 0.71, and 0.45 for the WT, and the 10, 5, and 0 aa linker channels, respectively. Thus, shortening the S3-S4 linker from 31 to 10 aa does not modify the voltage dependence of  $\tau_a$  and the complete removal of the linker induces a decrease of 0.56 in  $z_a$ . This decrease in  $z_a$  promotes a crossover of the  $\tau_a$  versus voltage curves for the 0 and 5 aa linker mutants (Fig. 4 A).

Fig. 4 B shows the delays ( $d$ ) as a function of voltage for the 10 (●), 5, and 0 aa linker mutant channels. Since  $d$  is the reciprocal value of the sum of all  $\alpha_i$  ( $i \neq j$ ), it is clear that one or more of the forward rate constants are affected by S3-S4 linker shortening. Surprisingly, the voltage dependence of  $d$  for the 0 aa linker mutant channel was found to be larger than that of the WT *Shaker* $\Delta$  and the rest of the linker mutant channels. It is possible for this channel that a transition with a large voltage dependence has become much slower than the rest of the forward rates.

Fig. 5 shows the voltage dependence of the deactivation kinetics obtained using the pulse protocol illustrated in the inset. In the range between  $-100$  and  $-50$  mV, the deactivation time constants are 6-, 3-, and 1.5-fold larger in the 0, 5, and 10 aa linker mutants than in the WT channel, respectively. The voltage dependence of the 0 aa linker mutant is essentially indistinguishable from the WT channel, and the equivalent number of gating charges related to channel deactivation,  $z_d$ , for the 5 aa linker mutant is 0.58 compared with 0.53 in the WT channel.

#### *A Large Cole-Moore Shift Is Present in the 5 aa Linker Mutant*

Cole and Moore (1960) found that  $K^+$  currents were delayed by hyperpolarizing prepulses a phenomenon that has been dubbed the Cole-Moore shift. The initial lag of the ionic currents reflects the early transitions of the activation pathway. A large hyperpolarizing prepulse will populate those closed states further removed from the open state, which results in a longer lag in the activation of the ionic current. In *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channels, an  $\sim 1$ -ms time shift of the ionic current onset is induced when the prepulse is varied from  $-150$  to  $-50$  mV (Stefani et al., 1994; Rodriguez et al., 1998). Fig. 6 A shows superimposed ionic current records for the 5 aa linker mutant elicited by a 50-mV test pulse for different conditioning prepulses ranging from  $-130$  to  $-40$  mV with the longest lag observed for the  $-130$ -mV conditioning pulse. The traces show unambiguously that the depolarizing prepulses produce a decrease in the time shift or delay of the onset of the ionic currents and that this delay is much more pronounced in the 5 aa linker mutant than in WT *Shaker*  $K^+$  channels (see Stefani et al., 1994). In Fig. 6, B–D, we have plotted the time shift promoted by the prepulses indicated in the abscissa for the 10, 5, and

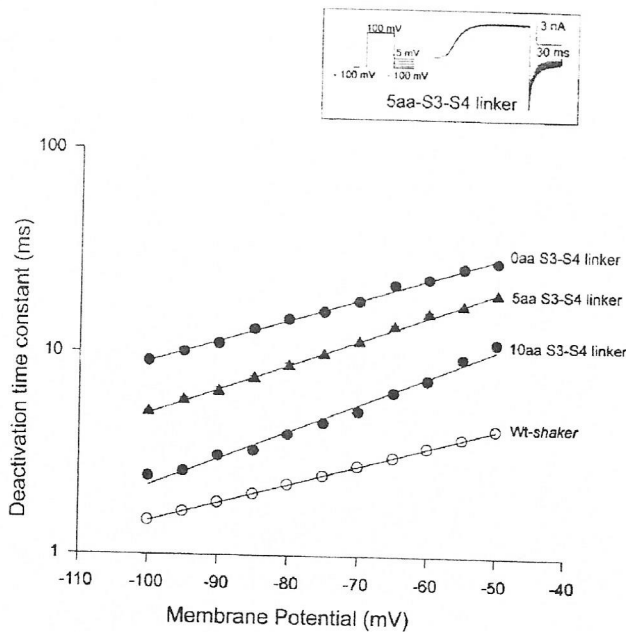


FIGURE 5. The time constants of current deactivation were obtained by fitting the tail currents after a 250-ms activating pulse to 15 mV as indicated in the pulse protocol shown in the inset. Time course was fitted with a single exponential. Solid lines are fit to the data using  $\tau_d = C \exp(-ZV/RT)$ , where  $\tau_d$  is the deactivation time constant,  $C$  is a constant, and  $Z$  defines the voltage dependence of  $\tau_d$ . The values of  $Z$  were:  $0.53 \pm 0.9$ ,  $0.8 \pm 0.08$ ,  $0.58 \pm 0.1$ , and  $0.69 \pm 0.08$  for the WT, and 10, 5, and 0 aa linker mutants, respectively.

0 aa linker mutant channels. In 10 aa linker channels, we observed that an  $\sim 1$ -ms time shift of the ionic current onset was induced when the prepulse was varied from  $-150$  to  $-40$  mV. This value is very similar to the one obtained with the WT channel. In the case of the 5 aa linker channel, the shift obtained with a  $-40$ -mV prepulse was 12.4 ms, which is  $\sim 12$ -fold larger than the time shift found for WT *Shaker*  $K^+$  channels (Rodriguez et al., 1998). Although smaller than the Cole-Moore shift found for the 5 aa linker mutant, the 0 aa linker mutant shows a pronounced delay in the ionic currents with hyperpolarization (Fig. 5 B). In this mutant, the shift obtained with a  $-40$ -mV prepulse was 8 ms.

#### Change in Gating Valence Induced by Complete S3-S4 Linker Removal

The next step was to determine whether the linker deletions modify the apparent number of gating charges per channel. If the S4 domain undergoes a large displacement during channel activation, this movement should be constrained by the linker length. Since the apparent number of charges per channel is the product of the valence  $z$  times the displacement  $\delta$  that each charge undergoes, an abridgment of the S4 motion imposed by the shorter linker should be manifested as a decrease in  $z\delta$ .

To calculate the number of effective charges per channel,  $z\delta$ , we have applied the limiting slope method (Almers, 1978; Sigg and Bezanilla, 1997; see MATERIALS AND METHODS). In this case, the voltage sensitivity of channel opening, measured at negative potentials in a range where the opening probability is low, yields a lower limit to  $z\delta$ . To increase the voltage resolution for the WT *Shaker*  $K^+$  and the linker mutant channels, we used slow ramp stimulation from  $-100$  to  $0$  mV (Fig. 7; Noceti et al., 1996; Seoh et al., 1996). This method is adequate for obtaining a quasi steady state G-V relationship at potentials more negative than  $-50$  mV. For larger depolarizations, conductance values are slightly underestimated due to the presence of a slow inactivation process. The steady state conditions were checked by varying the speed of the ramp and by testing the symmetry of the current in response to a symmetric triangular voltage wave. Fig. 7, A and E, confirmed the value of  $z\delta$  obtained in previous studies for the WT *Shaker*  $K^+$  channel (Zagotta et al., 1994b; Seoh et al., 1996; Noceti et al., 1996). A fit to the data at very negative potentials using Eq. 3 ( $P_o \rightarrow 0$ ; Fig. 7 A) gave a  $z\delta = 12.1$ . To verify the validity of our assumption  $P_o \rightarrow 0$ , we determined the slope of the logarithm of the G-V curve at low open probabilities, and  $z\delta$  at the different voltages was obtained using Eq. 4. When  $z\delta$  is plotted as a function of  $V$ , it reaches a plateau that is equal to the actual value of the limiting slope (Fig. 7 E), giving a value very close to that obtained by the exponential fit (straight line). For the WT *Shaker*  $K^+$  channels, we obtained a  $z\delta = 12.5 \pm 0.62$  ( $n = 5$ ), in reasonable agreement to the  $z\delta = 12.3$  found by Schoppa et al. (1992) or the  $z\delta = 12.8$  found by Noceti et al. (1997) and 12.6 found by Seoh et al. (1996). Essentially the same  $z\delta$  was found for the 10 aa linker mutant, Fig. 7, B and F ( $12.7 \pm 0.54$ ).

We used the ramp method to determine the  $z\delta$ 's of the 5 aa (Fig. 7, C and G) and the 0 aa (D and H) linker mutants. Fig. 7 C is the conductance corresponding to the ionic current flowing through 5 aa linker mutant channels in response to a ramp from  $-90$  to  $-20$  mV ( $1.2$  mV/s). The conductance values obtained for very negative voltages ( $-70$  to  $-50$ ) were fitted to Eq. 3 to approximate to the limit  $P_o \rightarrow 0$ . The calculated parameters of the fit were  $A = 5 \times 10^{13}$  nS and  $z\delta = 12.0$ . We also calculated  $z\delta$  at different voltages using Eq. 4 (Fig. 7 G) to obtain a  $z(V)$  versus  $V$  curve. Fig. 7 C shows that  $z\delta$  approaches a limiting value close to the fitted value obtained in Fig. 7 G (straight line). The average value for  $z\delta$  in the 5 aa linker mutant was  $12.3 \pm 0.87$ .

Fig. 7, D and H, illustrates a limiting slope experiment in the 0 aa linker mutant channel with the same strategy as the experiments shown in Fig. 7, A-G. In this case, a slow ramp from  $-90$  to  $-20$  mV ( $1.2$  mV/s) was used to induce the ionic current that was then converted into conductance (Fig. 7 D). Notice that for

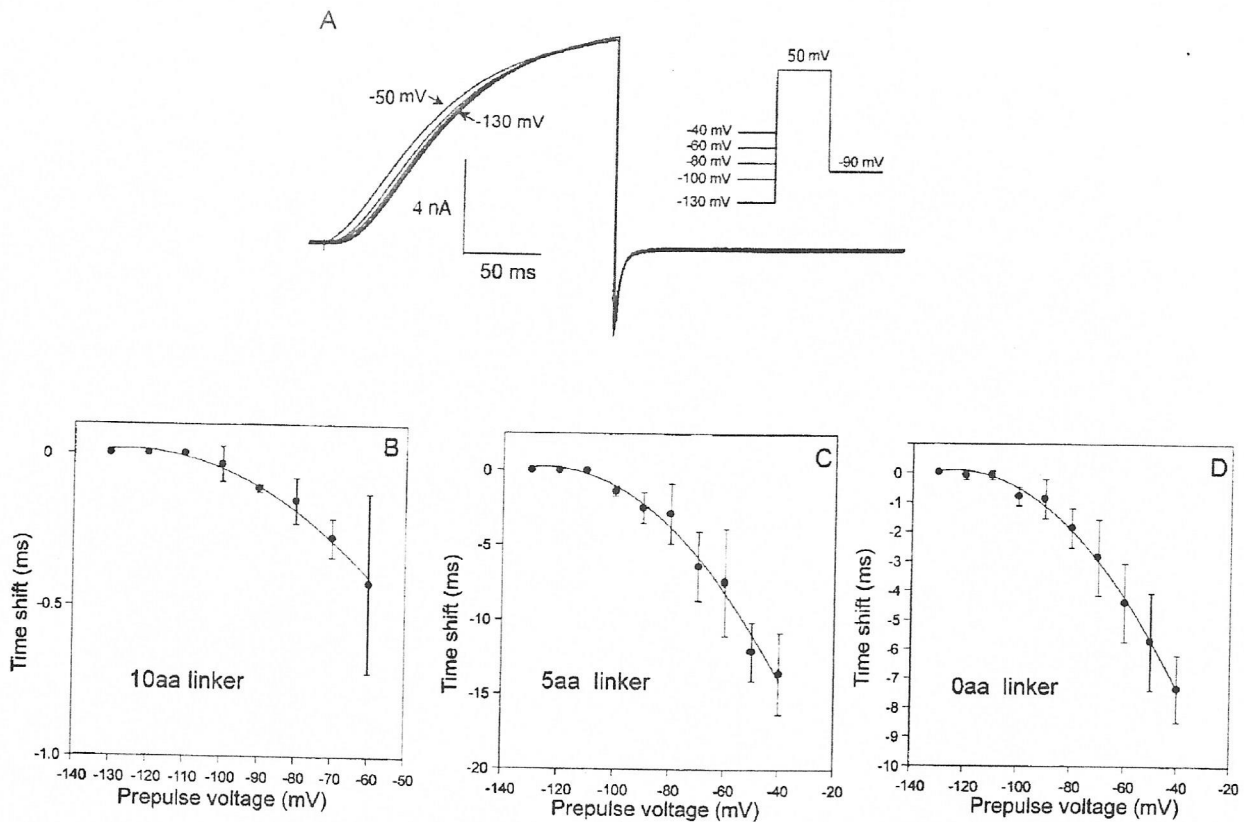


FIGURE 6. Kinetics of early transitions of the activation pathway using the Cole-Moore protocol. (A) Family of macroscopic ionic currents from 5 aa linker mutant channels elicited in response to the variable hyperpolarized prepulses shown in the pulse protocol followed by a 50-mV test pulse and a postpulse of  $-90$  mV. The holding voltage was  $-90$  mV. A  $P/4$  subtraction protocol was used. Data was filtered at 5 kHz and digitized every  $100 \mu\text{s}$ . (B) Delay or time shift due to the hyperpolarized prepulses for the linker mutant channels calculated from current records was measured by displacing the current records along the time axis until the best superposition was obtained. Lines in these plots were drawn by eye.

both the 5 and 0 aa linker mutants, very slow ramps were used to attain a quasi steady state  $G$ - $V$  curve, due to the slow activation kinetics showed by these two mutants (Fig. 2). The monoexponential fit to the initial part of the curve ( $-89$  to  $-67$  mV) produced the following parameters:  $A = 4 \times 10^7$  nS and  $z\delta = 5.21$ . As for the wild type and 5 aa linker mutant channels, a clear plateau in the curve  $z\delta$  versus voltage was observed, providing a good estimate of the total number of charges per channel displaced during activation. For the 0 aa linker mutant, the average  $z\delta$  obtained from seven experiments was  $5.6 \pm 0.32$ .

#### Noise Analysis Reveals the Same $P_o^{\text{max}}$ for WT Shaker and Mutant Channels

The maximum probability of opening for the WT Shaker  $K^+$  channel was determined using nonstationary fluctuation analysis (Sigworth, 1980) and is in the range of 0.73–0.79 (Schoppa et al., 1992; Noceti et al., 1996; Seoh et al., 1996). To avoid complications arising from channel inactivation, we measured the number of

channels ( $N$ ) at different stimulating frequencies and used only those frequencies that did not modify  $N$ . Fig. 8, A–C, shows variance analysis in the 10 aa linker mutant channel. Fig. 8, A and B, shows the time course of the average current for a  $+120$ -mV pulse and the corresponding variance versus time plot. The noise fluctuations in Fig. 8 B have a biphasic time course that is a reflection of the channel open probability during the activation of the ionic current. The variance-mean current plot in Fig. 8 C was fitted to Eq. 2. The fitted parameters were,  $N = 10,080$  channels and  $i = 0.95$  pA (average  $i = 0.560.3$ ,  $n = 5$ ). The maximum open probability was obtained using the relation  $P_o^{\text{max}} = I_{\text{max}}/iN$  and was 0.73. The average  $P_o^{\text{max}}$  calculated from five different cell-attached patches was  $0.74 \pm 0.03$ .

The maximum open probability for the 5 aa linker mutant was also estimated by nonstationary fluctuation analysis (Fig. 8, D–F). As with the 10 aa linker mutant, a parabolic relationship between the variance and the mean current was seen for the 5 aa linker mutant (Fig. 8 F), leading to accurate estimates of  $N$  and  $P_o^{\text{max}}$ . The solid line in Fig. 8 F is a fit to the variance–mean cur-



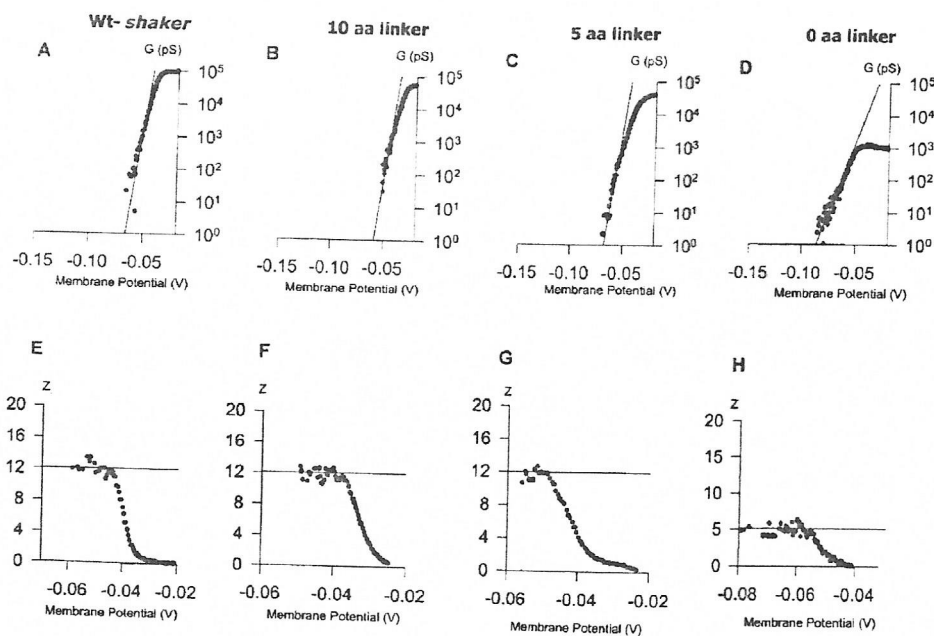


FIGURE 7. Limiting slope analysis in wild-type *Shaker* $\Delta$  and the S3-S4 linker mutant channels. (A-D) Semilogarithmic plot of the G vs. V relationship of the different mutants. The solid line indicates the fitting of the low probability data in order to determine the limiting value of  $z$ . (E-H)  $z$  vs. V plot of the corresponding mutants indicated above the A-D graphs. The solid line indicates the asymptotic value of  $z$  at very hyperpolarizing voltages obtained by the derivative with respect to the voltage of the monoexponential fit of the low probability data.

rent data with  $N = 10,000$  channels,  $i = 0.82$  pA (average  $i = 0.730.2$ ,  $n = 8$ ), and the calculated  $P_o^{\max}$  was 0.75 (average  $P_o^{\max} = 0.76 \pm 0.05$ ). In the case of the 0 aa linker mutant channel, Fig. 8, G and H, shows the time course of the average current for a +120-mV pulse and the corresponding variance versus time plot. The solid line in Fig. 8 I is a fit to the variance-mean current data with  $N = 890$  channels,  $i = 0.36$  pA, (average  $i = 0.540.3$ ,  $n = 5$ ), and the calculated  $P_o^{\max}$  was 0.73.

## DISCUSSION

### General

By inserting an epitope at different positions in the S3-S4 linker, Shih and Goldin (1997) determined that the minimum length of the linker was established to extend from amino acid 333 to 356. Shih and Goldin (1997) modeled the S3-S4 loop as the 30 amino acid region extending from amino acid ala328 to leu358,

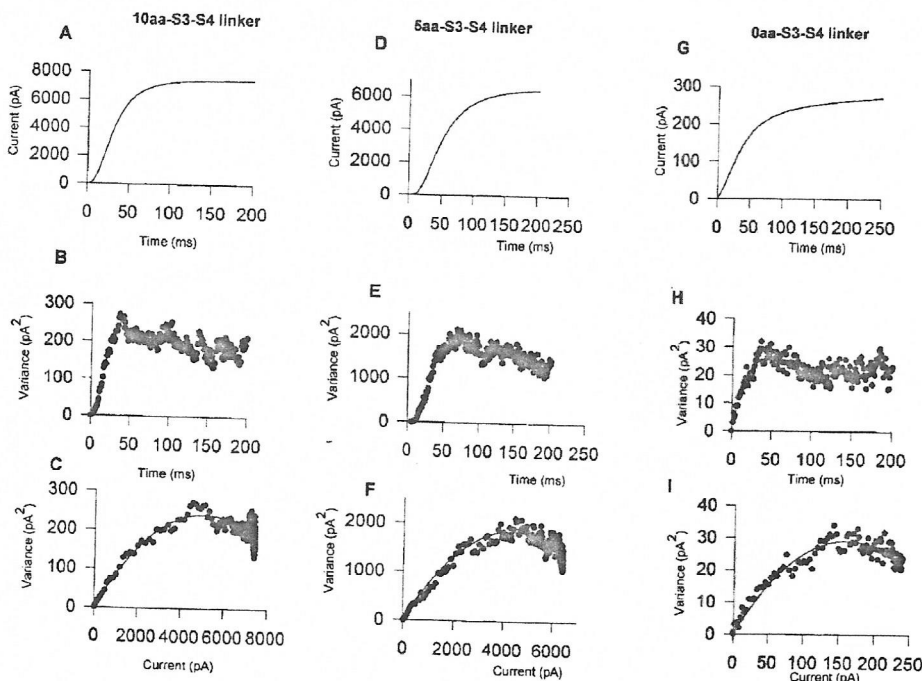


FIGURE 8. Variance analysis for three deletion mutants. (A, D, and G) Mean current traces obtained from 256 traces recorded with the patch technique from a holding potential of  $-100$  mV to a test pulse potential of  $120$  mV. (B, E, and H) Time course of the variance. (C, F, and I) Variance versus current fitted to the function  $\sigma^2 = iI(t) - I(t)^2/N$  (solid line). The mean maximum open probability ( $P_o^{\max}$ ) among the different mutants was 0.75.

and Wallner et al. (1996) defined the linker as the segment comprised of residues val330–ileu360. In the present study, we used the Wallner et al. (1996) definition to investigate the role of the S3–S4 loop.

The initial studies on the role of the S3–S4 linker performed by Mathur et al. (1997) showed only minor effects on the gating kinetics of the *Shaker*Δ by the introduction of point mutations in the *Shaker*Δ S3–S4 linker. Replacement of the *Shaker*Δ S3–S4 linker by the shorter (7 aa) linker of *Shaw* resulted in a three- to fourfold slowing down in the activation kinetics and in voltage shifts of the G–V curves of –13 mV. The linker definition of Mathur et al. (1997) extended from amino acid 333 and also included the serine located at position 357. Therefore, according to our linker definition, the linker still contained 13 amino acid residues even when they replaced the linker by the shorter, 7 aa linker of *Shaw*. We found that a mutant containing a linker as short as 10 aa (VVNRSMSLAI; Fig. 1) behaves as *Shaker*Δ in almost every respect except for slower speed of activation and deactivation (approximately twofold) and an increase in the slope (Table I), possibly due to an increase in positive cooperativity between subunits. Our results obtained using the 5 and 0 aa linker mutants are interesting in four respects. First, the main effect of the mutations was to slow down dramatically the activation kinetics and, to a much lesser extent, the speed of deactivation. Second, we expected to find an inverse relationship between speed of activation and linker length. Contrary to this expectation, we found that for voltages smaller than 60 mV the speed of activation was much slower in the 5 aa mutant linker than in the 0 aa mutant linker. However, for voltages >60 mV, the speed of activation of the 0 aa linker channel became slower than that of the 5 aa linker channel mutant. On the other hand, the speed of deactivation decreased inversely with S3–S4 linker length. Third, we found no evidence for a change in the gating valence for the 5 aa linker mutant, but in the 0 aa linker mutant the valence was halved. Fourth, the  $P_o^{\max}$  was the same for *Shaker*Δ and the three mutants studied here.

The results obtained with the 5 aa S3–S4 linker mutant suggest that the linker length determines to a great extent the activation and deactivation channel kinetics. Moreover, the fact that in this mutant  $\delta$  and  $P_o^{\max}$  are not altered suggests that a 5 aa linker is enough to allow for the full displacement of the voltage sensor and for normal coupling between voltage-dependent gating and pore opening.

Complete deletion of the S3–S4 linker in *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channels greatly slows down the activation (~45-fold) and deactivation (~6-fold) kinetics compared with the wild-type *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channel. These changes in channel gating kinetics are accompanied by a shift toward depolarizing voltages of the G–V curve. The shift to the

right, measured at  $P_o = 0.5$ , induced by complete removal of the S3–S4 linker, is 45 mV. The change in free energy,  $\Delta\Delta G$ , due to the linker deletion can be calculated using the expression:

$$K(0)_{0aa}/K(0)_{WT} = (-\Delta\Delta G/RT), \quad (8)$$

where the values of the equilibrium constants for the 0 aa linker [ $K(0)_{0aa}$ ] and the WT *Shaker* [ $K(0)_{WT}$ ] channel are those of Table I.  $K(0)$  values were obtained using Eq. 6 for the 0 aa linker and Eq. 7 for the wild type. Comparison of the  $K(0)$  values is meaningful since  $K(0)$  determines the equilibrium between resting or an active conformation of subunits in both cases. Different equations are needed since, for the WT *Shaker* K<sup>+</sup> channel, an extra process is required to reach the open state. Using Eq. 8, we obtain a  $\Delta\Delta G = 1.2$  kcal/mol. This is a relatively small free energy change considering that the whole linker was deleted, and suggests that the conformational change of the S4 domain during activation does not involve extensive changes in sensor structure (see below). Most notably, deletion of the S3–S4 linker in *Shaker*Δ K<sup>+</sup> channels decreases the apparent gating valence from 13  $e_o$  in *Shaker*Δ K<sup>+</sup> to 5.6  $e_o$ , with no change in the  $P_o^{\max}$ . The  $P_o^{\max}$  is determined by transitions that have little or no voltage dependence; such transitions account for *Shaker*'s single channel data at depolarized voltages and are outside of the activation path (Schoppa and Sigworth, 1998b). The fact that  $P_o^{\max}$  is not affected by decreasing the S3–S4 linker length strongly suggests that these transitions are not modified in the S3–S4 linker mutants.

#### *Possible Interpretations of the Decrease in $\delta$ of the 0 aa Linker Mutant Channel*

The studies of Cha and Bezanilla (1998) indicated the presence of an external water-filled vestibule lining the external region of the S4 segment. Fluorescence studies (Sørensen et al., 2000) suggest that the majority of the protein vestibule and the group(s) involved in quenching of fluorescence signals outside the S4 segment in the wild-type channel reside in the S3–S4 linker. Since deleting the S3–S4 linker promotes a reduction of ~7  $e_o$ , we conclude that despite the drastic reduction in total charge movement without modifying  $P_o^{\max}$ , deletion of the S3–S4 linker did not affect the open position in the movement of the voltage sensor. Assuming that the S4 movement does not change in magnitude and a static S3 segment, an attractive hypothesis to explain this result would be that deletion of the linker makes the vestibule disappear (see Sørensen et al., 2000). If this is the case, we expect a decrease in the electrical distance ( $\delta$ ) traversed by some of the gating charges as pictured in Fig. 9 since after linker deletion they would be "inside" the dielectric region.

However, the decrease in  $z\delta$  can also be due to the appearance of new open states connected by voltage-dependent rates induced by the linker deletion. The limiting slope method gives an estimate of the number of gating charges displaced between closed states and the first open state (Noceti et al., 1996; Sigg and Bezanilla, 1997). The charge moved between open states is not detected by the limiting slope method. We argue that this possibility is not very likely since, in the 0 aa linker mutant channel, about half of the charges are lost, implying that as much as 6  $e_0$  are now being displaced between open states. For this to happen, we are forced to conclude that either a large amount of charge moves between a few open states, or that the linker deletion created a large number of open states where the "lost" gating charge is displaced. If the open states differ in their conductance, the variance versus mean ionic current data should deviate from the simple relation given in Eq. 1. The noise in the mean versus variance plot shown in Fig. 8 I makes it difficult to decide the presence of more than one conducting state.

It is also possible that the correct value of the total charge is not estimated properly because the applied voltages were not negative enough to reach a  $P_o$  low enough (Andersen and Koeppe, 1992; Schoppa et al., 1992; Bezanilla and Stefani, 1994; Zagotta et al., 1994a). As pointed out by Zagotta et al. (1994a), a test of having reached the true limiting slope is to plot  $z\delta$  vs.  $P_o$ , where it is possible to visualize whether the estimate shows signs of reaching a limiting value. Fig. 7 H shows that  $z\delta$  has reached a saturating value and that, with the caveat of the possible presence of several open states, this represents the total charge movement. In principle, it is possible to determine  $z\delta$  by determining the total charge ( $Q$ ) displaced and the number of channels ( $N$ ) in the membrane area considered (Schoppa et al., 1992; Seoh et al., 1996; Noceti et al., 1996). However, until now we have failed to detect gating currents in the 0 aa linker mutant, most probably due to its very slow activation and deactivation kinetics. Since gating currents measurements are not yet possible for this mutant, we have used the Cole-Moore shift as a measure of the charge displacement at voltages more negative than  $-80$  mV, which is the most negative voltage we used to estimate the charge with the limiting slope method. Although there is some Cole-Moore shift between  $-80$  and  $-100$  mV, the voltage dependence of the shift is so low that it is very unlikely that the missing six electron charges are mobilized at voltages more negative than  $-80$  mV.

#### Kinetic Effects of Mutations

The analysis of the Cole-Moore shift of the ionic currents indicates that shortening the S3-S4 linker slows down transitions between closed states further removed

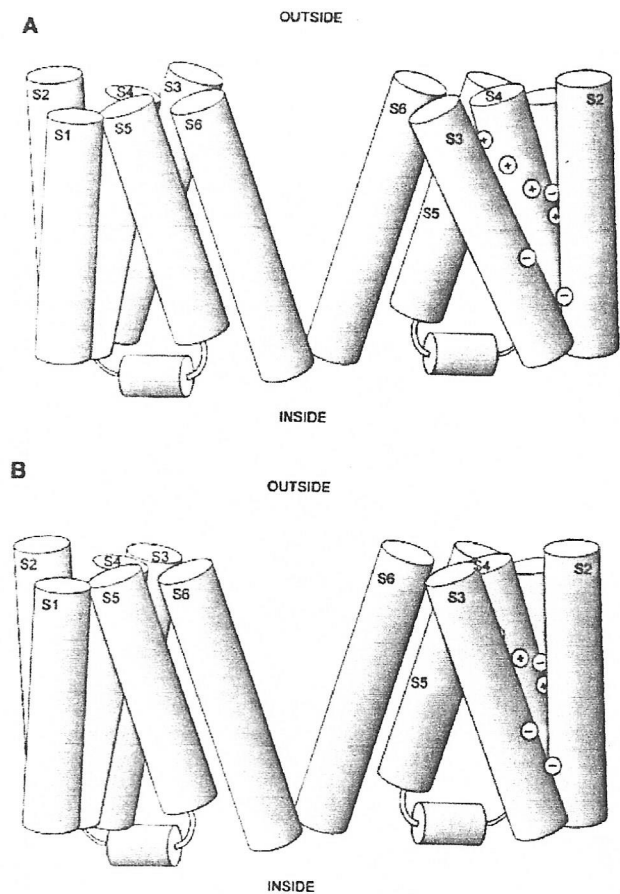


FIGURE 9. Model of the structure of all six segments of the *Shaker* K channel, which accounts for the observations described in the present study (Cha et al., 1999; Bezanilla, 2000). (A) Two subunits facing each other across the pore are shown. This allows the observation of the back face of the left subunit and the front face of the right subunit. Only the open configuration of the channel is shown. In this model, depolarization rotates the S4 segment in  $180^\circ$ , and charges that were facing the intracellular solution by being in the crevice formed by S1 and S5 are displaced towards the extracellular solution remaining in a water-filled crevice formed by segments S2 and S3. This requires an S4 movement of no more than a few Angstroms and explains why a 5 aa linker allows for the movement of all the channel gating charges. (B) When the whole S3-S4 linker is removed, the S3 and S4 segments are closer together, decreasing the width of the crevice formed by the S2 and S3 segments. This has the effect of widening the region where the electric field falls, with the consequent decrease in  $z\delta$ .

from the open state. A quantitative comparison of the kinetics of the rate-limiting step of activation was obtained for *Shaker* $\Delta$  and the S3-S4 linker mutants. This was done by determining activation time constants from monoexponential fits of the rising phase of the test pulse currents. The analysis of the data shows that transitions in the activation pathway and near the open state are also greatly affected by shortening the linker to 5 or 0 amino acids. The 5 aa linker has an 88-fold slower activation than the *Shaker* $\Delta$  channel with no dif-

ference in the voltage dependence (Fig. 4 A). In the case of the 0 aa linker mutant channel, the difference in activation speed with the *Shaker* $\Delta$  is 45-fold at 0 mV. The experimental protocols we used do not allow conclusions about the effect of the mutations on the backward rates in the activation pathway. However, Sørensen et al. (2000) found that both the on and off gating currents are very slow in the 5 aa linker mutant channel. This result suggests that decreasing the length of the linker restricts the movement of the gate in the direction of the deepest closed states.

If the ratio of activation time constants between the 5 aa linker and the *Shaker* $\Delta$  channel is assumed to be related to the difference in the energy necessary to displace the voltage sensor,  $\Delta\Delta G$ , this energy amounts to 2.7 kcal/mol. In both the 5 and 0 aa linker channel mutants, the deactivation rate constant is much less affected than the activation process. Thus, a difference of sevenfold in deactivation rates between *Shaker* $\Delta$  and the 0 aa linker implies a  $\Delta\Delta G = 1.2$  kcal/mol. The interpretation of this difference is obscured by the fact that the forward rate of the last transition,  $\alpha_N$ , (Scheme III) is much faster than the rates of the previous forward rates, and even at  $-100$  mV can have values comparable with the backward rate,  $\beta_N$  (Schoppa and Sigworth, 1998a).

In summary, shortening the S3–S4 linker to  $<10$  amino acids appears to increase all the energy barriers separating the various kinetic transitions leading to channel opening. It is interesting to note that, with the exception of the extreme case of the 0 aa linker channel, these kinetic effects occurred in the absence of large changes in the voltage dependence of activation.

#### A Model Consistent with Results

The total charge per channel of the WT *Shaker* $\Delta$  estimated by three different methods is between 12.6  $e_0$  (Seoh et al., 1996) and 13.6 (Aggarwal and MacKinnon, 1996); most of this charge is contained in the S4 domain. Moreover, the fact that the  $Q/N$  and the limiting slope method give the same  $z\delta$  indicates that all the nonlinear charge in *Shaker* $\Delta$   $K^+$  channel is involved in channel opening (Seoh et al., 1996). Using neutralization mutants, Aggarwal and MacKinnon (1996) and Seoh et al. (1996) showed that arginines 362, 365, 368, and 371 contribute to the total gating charge. On the other hand, the results obtained with cysteine-scanning mutagenesis indicate that a conformational change of the S4 domain occurs during depolarization that results in a large change in the exposure of charged residues (Larsson et al., 1996; Yusaf et al., 1996; Baker et al., 1998). More recently, Starace and Bezanilla (1998, 1999) replaced the arginines by histidines (histidine-scanning mutagenesis) and found that these four charges change exposure from inside to outside upon depolarization.

Thus, four of the seven positive charges contained in the S4 domain move from the inner to the outer surface of the membrane upon depolarization. Several models have been proposed to explain the conformational change that the S4 domain undergoes during the channel activation process. One model proposes a helical-screw motion of an  $\alpha$ -helical S4 region (Durell and Guy, 1992; Catterall, 1996), which would imply an S4 segment displacement of 1.5 nm. This model also requires an S3–S4 linker long and flexible enough to allow for such a displacement. A second model involves a change in secondary structure from a helix in one state (for example, closed) to a loop in another state (helix-coil transition model; Guy and Conti, 1990; Sigworth, 1994; Aggarwal and MacKinnon, 1996). This model has a precedent in voltage-dependent gating of colicin channels. In this case, a large segment of the protein is transferred across the entire membrane upon activation (Slatin et al., 1994; Qiu et al., 1996).

Our results show that a very short linker is sufficient for the full displacement of the S4 segment. This result is inconsistent with the sliding helix model of Durell and Guy (1992), but can be interpreted in terms of a model in which charge displacement involves small movements of the voltage sensor (Papazian and Bezanilla, 1997) or in terms of the helix-coil transition model. As proposed, the helix-coil transition model also involves a large displacement of the charges contained in the S4 domain. Contrary to this expectation, recent evidence strongly suggests that the displacement of the gating charge is small and that the field is focused in a very thin low dielectric constant region. First, using lanthanide-based resonance energy transfer, Cha et al. (1999) determined that a residue in the S3–S4 linker moves  $\sim 3$  Å between adjacent subunits. Second, histidine-scanning mutagenesis indicates that the transmembrane electric field is concentrated in a low dielectric region so narrow that the histidine 362 can bridge the hydrophobic span and gate open a  $H^+$  channel (Starace and Bezanilla, 1999).

All the above evidence suggests that the S4 segment undergoes a rotation (Yellen, 1998; Cha et al., 1999; Bezanilla, 2000), as depicted in Fig. 9. In this model, the lining of the internal water-filled crevice is made up by the S1 and S5 transmembrane segments, and depolarization induces up to  $180^\circ$  rotation of the S4, exposing the charges to an external crevice formed by the S2 and S3 segments. Deleting the S3–S4 linker in this model would have the effect of narrowing the external crevice. Despite the fact that the charges would move the same absolute distance, some charge would not be able to cross the entire thickness of the low dielectric region. Therefore, as a consequence of this narrowing in the width of the external crevice, the number of apparent gating charges will decrease when the S3–S4 linker



- proton transport by the voltage sensor of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 19:1319-1327.
- Stefani, E., L. Toro, E. Perozo, and F. Bezanilla. 1994. Gating of *Shaker* K channels. I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66:996-1010.
- Wallner, M., P. Meera, and L. Toro. 1996. Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in high conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:14922-14927.
- Yang, N., and R. Horn. 1995. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*. 15:213-218.
- Yang, N., A.L. George, and R. Horn. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 16: 113-122.
- Yellen, G. 1998. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 31:239-295.
- Yusaf, S.P., D. Wray, and A. Sivaprasadarao. 1996. Measurement of the movement of the S4 segment during activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflügers Arch.* 433:91-97.
- Zagotta, W.N., and R.W. Aldrich. 1990. Voltage-dependent gating of *Shaker* A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J. Gen. Physiol.* 95:29-60.
- Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich. 1994a. *Shaker* potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103:321-362.
- Zagotta, W.N., T. Hoshi, J. Dittman, and R.W. Aldrich. 1994b. *Shaker* potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* 103:279-319.



## ANEXO II

Metodología *in extenso* para el desarrollo de la tesis doctoral**1. Determinación de la conductancia macroscópica**

Para obtener la conductancia macroscópica (G) máxima se aplicaron pulsos cuadrados de potencial. A este potencial lo denominamos **potencial de prueba** (*test potencial*). Los potenciales de prueba van desde valores a los cuales todos los canales están cerrados (negativos en el caso del canal *Shaker*) a potenciales muy positivos con el objetivo de abrir el máximo número de canales. El potencial de prueba se termina dando un potencial negativo cuyo valor es *constante* y que promueve el cierre de todos los canales. A éste lo denominamos **potencial de cola** y a la corriente que se genera, **corriente de cola**. Es claro que si la conductancia durante el pulso de prueba ha llegado a un máximo, la corriente de cola será la misma aunque el pulso de prueba sea mayor. A esta corriente la llamamos **corriente máxima** ( $I_{\max}$ ). La relación entre la corriente de cola (I) obtenida y el voltaje de prueba se conoce como curva G-V y está dada por el siguiente análisis:

$$I = G (V_{\text{cola}} - E_K) \quad (1.1A)$$

donde I es la corriente de  $K^+$  medida y  $E_K$  es el potencial de equilibrio del potasio. Cuando I es máxima, entonces:

$$I_{\max} = G_{\max} (V_{\text{cola}} - E_K) \quad (1.2A)$$

Si dividimos ambas expresiones, teniendo en cuenta que el voltaje es el mismo al final del cada pulso, obtenemos:

$$I / I_{\max} = G / G_{\max} \quad (1.3A)$$

La conductancia normalizada ( $G/G_{\max}$ ) se graficó en función del potencial de prueba y si la cinética del canal queda bien descrita por un modelo de dos estados los datos se pueden ajustar a una ecuación de Boltzmann.

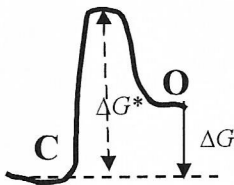
## 2. Ajuste de la $G-V$ ó $Po-V$ a una ecuación de Boltzmann

Si suponemos el modelo cinético más simple para un canal: cerrado (C) y abierto(O):  $C \leftrightarrow O$ , entonces, la probabilidad de encontrar al canal abierto ( $Po$ ) está dado por la expresión:

$$Po = O / (O + C) \quad (2.1A)$$

y si definimos constante de equilibrio  $K$  como el cociente  $C/O$ , entonces:

$$Po = I / (I + K) \quad (2.2A)$$



**Fig 1A.** Esquema de niveles energéticos para los estados cerrado (C) y abierto (O) en un canal. Con una flecha continua se muestra el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) para la transición C-O y con flecha discontinua se señala la energía de activación ( $\Delta G^*$ ).

Según el diagrama de energía (Fig 1A), la energía libre del sistema  $\Delta G$  está dada por la diferencia del canal en el estado abierto al canal en el estado cerrado:  $G(c) - G(o)$ . La relación entre  $\Delta G$  y la constante de equilibrio está dada por  $K(v) = e^{-\frac{\Delta G_o}{RT}}$  y al aplicar una energía eléctrica  $zFV$ ,  $K(v)$  está

dada por la expresión:

$$K(v) = e^{-\frac{\Delta G_0 + zFV}{RT}} \quad (2.3A)$$

Si  $\Delta G=0$  para  $V_{1/2}$  y  $\Delta G = \Delta G_0 + zFV$ , entonces  $0 = \Delta G_0 + zFV_{1/2}$  y por tanto  $\Delta G_0 = -zFV_{1/2}$ . Sustituyendo esta expresión en la ecuación 2.3A,

entonces  $K(v) = e^{-\frac{zF(V - V_{1/2})}{RT}}$ , si sustituimos esta ecuación en la

expresión 2.2 entonces obtenemos que

$$P_o = \frac{1}{\left[1 + e^{-\frac{(V - V_{1/2})zF}{RT}}\right]} \quad \text{Ecuación de Boltzmann (2.4A)}$$

Como la corriente macroscópica (I) está dada por: el número de canales contenidos en el parche estudiado (N), la corriente que pasa por un canal único (i) y la probabilidad de que esos canales estén abiertos ( $P_o$ ), es claro entonces que:

$$I = i N P_o \therefore I_{\max} = i N P_{o_{\max}} \quad (2.5A)$$

Si consideramos que el máximo valor que puede tomar la probabilidad es

1 ( $P_{o_{\max}} = 1$ ), entonces:

$$I/I_{\max} = P_o/P_{o_{\max}} \quad (2.6A)$$

Recordando que  $I / I_{\max} = G / G_{\max}$ , y  $P_o/P_{o_{\max}} = I/I_{\max}$ , entonces para nuestro modelo de dos estados:

$$\boxed{\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{\left[1 + e^{-\frac{(V - V_{1/2})zF}{RT}}\right]}} \quad (2.7A)$$

### 3. Ajuste Po-V a una ecuación de Boltzmann a la cuarta para Shaker

El canal de potasio tipo *Shaker* es un tetrámero y tiene un sensor de voltaje en cada subunidad. Supongamos que cada sensor puede estar en uno de dos estados: en reposo (**R**) o activado (**A**). Si la probabilidad de encontrar un sensor en el estado **A**, que permite que el canal se abra es igual a  $P_A$ , entonces:

$$P_A = \frac{1}{[1 + e^{-(V-V_{1/2})zF/RT}]} \quad (2.8A)$$

Si suponemos un modelo en que cada uno de los sensores son independientes (modelo más simple), entonces para que un canal se encuentre abierto, deben estar las **cuatro** subunidades activadas, entonces:

$$P_O = P_A^4 = \left[ \frac{1}{[1 + e^{-(V-V_{1/2})zF/RT}]} \right]^4 \quad (2.9A)$$

Si  $z(V-V_{1/2})$  es infinitamente grande y negativo (límite de la función a voltajes menos infinito) la función exponencial a la cuarta potencia crece, por lo que se puede simplificar a la expresión:

$$P_O = e^{4(V-V_{1/2})zF/RT} \quad (2.10A)$$

Si aplicamos logaritmo neperiano a ambos lados obtenemos:

$$\ln P_o = 4(V - V_{1/2})zF / RT \quad (2.11A)$$

para probabilidades muy pequeñas el logaritmo de la probabilidad de encontrar el canal abierto es una función del voltaje con pendiente  $4zF/RT$ . Donde  $4z$  es la suma de las valencias de los cuatro sensores.

#### *4. Pendiente límite.*

De esta forma se puede calcular la valencia o el número total de cargas de compuerta asociadas a la apertura del canal. Es por ello que a este método se le conoce como: "Pendiente límite" y puede ser un método general para canales con  $n$  estados.

El número total de cargas de compuerta ( $Z_{eq\ lim}$ ) fue obtenido a partir del ajuste de la ecuación 16 (resultados) a los datos de  $P_o$  en función del potencial, en el intervalo de probabilidades de 0,001 a 0,01:

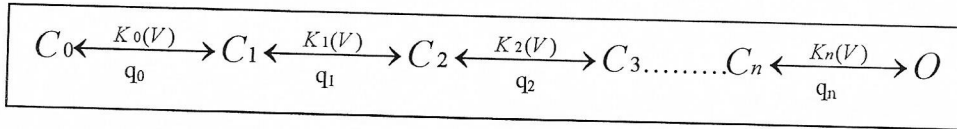
$$P_o = A e^{Z_{eq\ lim} F / RT} \quad (3.1A)$$

Esta expresión es la aproximación monoexponencial de la distribución de Boltzmann en el límite para potenciales muy negativos, donde  $A$  es la amplitud de la exponencial.

Con este fin los datos fueron graficados con la ordenada en escala logarítmica, pues a probabilidades bajas ( $P_o \sim 0,01$  a  $0,001$ ) la relación  $P_o$ - $V$  graficada en esta forma se hace lineal.



Supongamos que los canales obedecen a un modelo cinético lineal dependiente del potencial, con  $n$  estados en donde sólo el último estado es un estado abierto:



consecutivos  $i-1$  e  $i$ , está dado por la constante de equilibrio dependiente de voltaje  $K_i$ . La transición entre  $i-1$  e  $i$  es acompañada por un movimiento de carga de magnitud  $q_i$ .

$$\frac{P_{\text{estado}(i-1)}}{P_{\text{estado}(i)}} = K_i = K_i(0)e^{-q_i V / RT} \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (3.2A)$$

Donde  $K_i(0)$  es la constante de equilibrio a potencial cero. Para este esquema cinético lineal se tiene que la probabilidad de apertura  $P_o$  es

$$P_o \equiv P\{O\} = \frac{O}{O + \sum_0^n C_i} = \frac{1}{1 + \frac{\sum_0^n C_i}{O}} \quad (3.3A)$$

Usando la ecuación se tiene:

$$\left. \begin{aligned} \frac{C_n}{O} &= K_n \\ \frac{C_{n-1}}{C_n} &= K_{n-1} \therefore \frac{C_{n-1}}{O} = K_n K_{n-1} \\ \text{M} \\ \frac{C_0}{C_1} &= K_0 \therefore \frac{C_0}{O} = K_n K_{n-1} \dots K_1 K_0 \end{aligned} \right\} (3.4A)$$

De la sustitución de las expresiones obtenidas en (3.4<sup>a</sup>) en (3.3<sup>a</sup>) obtenemos:

$$P_0 = \frac{1}{1 + K_n + K_n K_{n-1} + \dots + K_n K_{n-1} \dots K_2 K_1 K_0} \quad (3.5A)$$

Reemplazando la ecuación (3.2A) en (3.5A):

$$P_0 = \frac{1}{1 + K_n(0)e^{-qnV/RT} + K_n(0)K_{n-1}(0)e^{-(qn+qn-1)V/RT} + \dots + K_n(0)K_{n-1}(0)\dots K_2(0)K_1(0)K_0(0)e^{-V\sum q_i/RT}} \quad (3.6)$$

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} P_0 = \kappa e^{QV/RT} \quad (3.7A)$$

$$V \rightarrow -\infty$$

Donde

$$Q = \sum q_i \quad y \quad \kappa = 1 / K_n(0) \dots K_0(0)$$

Así se puede estimar la carga total por canal si es posible medir  $P_0$  a valores de potencial lo suficientemente negativos.

$$\ln P_0 = \ln \kappa + QV / RT \therefore$$

$$Q = \frac{RT}{F} \frac{d \ln P_0}{dV} \quad (3.8A)$$

La ecuación (3.8A) señala que cuando se alcanza la carga límite, la pendiente de  $d \ln P_0 / dV$  llega a ser constante y se alcanza la pendiente límite.

### ***5. Análisis de varianza.***

El análisis de varianza, conocido también como “determinación del ruido” producto a la apertura y cierre de canales de iones, es una metodología que permite obtener, a partir de la medición de corrientes macroscópicas, los parámetros de: corriente unitaria ( $i$ ), número de canales en el parche estudiado ( $N$ ) y probabilidad de apertura máxima para la población de canales estudiados ( $P_{O_{max}}$ ).

Estos canales pueden encontrarse en diferentes estados: cerrados, abiertos o inactivados; sin embargo este método en particular no permite discriminar la rapidez con que se cierran o abren estas proteínas, en otras palabras, no entrega ninguna información cinética. A pesar de que el análisis de ruido se basa en trabajos de 1975 realizados por Begegnisich y Stevens, el mito de su complejidad teórica-práctica obliga a discutirlo con más detalles en este capítulo, como una de las metodologías implementadas recientemente en nuestro laboratorio.

Para el análisis de varianza a partir de las corrientes macroscópicas es necesario realizar las siguientes suposiciones:

1. Todos los canales son iguales
2. No hay interacción entre los canales

3. Los canales se encuentran sólo en dos estados: conductor o no conductor.

Sobre las bases de estas consideraciones se determina la intensidad de corriente promedio y la varianza de estas corrientes para un canal y una población de N canales.

*a. Determinación de la corriente promedio en una membrana con un solo canal y con N canales.*

Supongamos por una parte, que la intensidad de la corriente para un canal cerrado es 0 y la intensidad de la corriente para ese canal abierto es  $i$ . Y por otra parte que la probabilidad de encontrar el canal abierto es  $p$  y la probabilidad de encontrar el canal cerrado es  $q$  (donde  $p + q = 1$ ). Entonces si la intensidad de corriente promedio que pasa a través de un sólo canal es *la suma de la corriente de cada estado multiplicada por la probabilidad de cada estado*, se tiene:

$$\langle I \rangle = 0q + ip \quad (1)$$

$$\langle I \rangle = ip \quad (2)$$

Según la ecuación 1 y aplicando el concepto anterior para dos canales la intensidad de la corriente promedio será:

$$\langle I \rangle = 0q^2 + i2pq + 2ip^2$$

$$\langle I \rangle = 2ip (q+p) = 2ip$$

Por inducción completa según lo anterior, es claro que para  $N$  canales entonces la corriente promedio será:

$$\langle I \rangle = Nip$$

b. *Determinación de la varianza en una membrana con un solo canal y con  $N$  canales.*

Si la varianza ( $\sigma^2$ ) es la suma de las desviaciones de la corriente de cada estado con respecto a la corriente promedio, elevadas al cuadrado y multiplicadas por la probabilidad de cada estado, entonces para un canal:

$$\sigma^2 = (0 - ip)^2q + (i - ip)^2p$$

$$\sigma^2 = i^2p^2q + i^2(1 - p)^2p$$

$$\sigma^2 = i^2pq(p + q), \text{ recordemos que } p+q=1 \text{ entonces,}$$

$$\sigma^2 = i^2pq$$

Para el caso de una membrana con dos canales y teniendo en cuenta la definición anterior podríamos escribir que en este caso la varianza es:

$$\sigma^2 = (0-2ip)^2q^2 + (i-2ip)^2 2pq + (2i-2ip)^2p^2$$

$$\sigma^2 = i^2(4p^2q^2 + 2(1-2p)^2pq + 4(1-p)^2p^2)$$

$$\sigma^2 = 2i^2pq(2pq + (q - p)^2 + 2qp)$$

$$\sigma^2 = 2i^2pq(4pq + q^2 - 2pq + p^2)$$

$$\sigma^2 = 2i^2pq(q^2 + 2pq + p^2)$$



$$\sigma^2 = 2i^2pq(p + q)^2$$

$$\sigma^2 = 2i^2pq$$

Por inducción completa es evidente que para N canales la varianza de la corriente es:

$$\sigma^2 = Ni^2pq$$

c. Relación entre la varianza y la corriente promedio para N canales.

Si la varianza para N canales es:

$$\sigma^2 = i^2Npq \text{ y } q=1-p, \text{ entonces}$$

$$\sigma^2 = i^2Np(1-p)$$

$$\sigma^2 = i^2Np - i^2Np^2 \text{ y si para N canales } \langle I \rangle = Nip$$

$$\sigma^2 = i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} \quad (3) \text{ Ecuación de varianza}$$

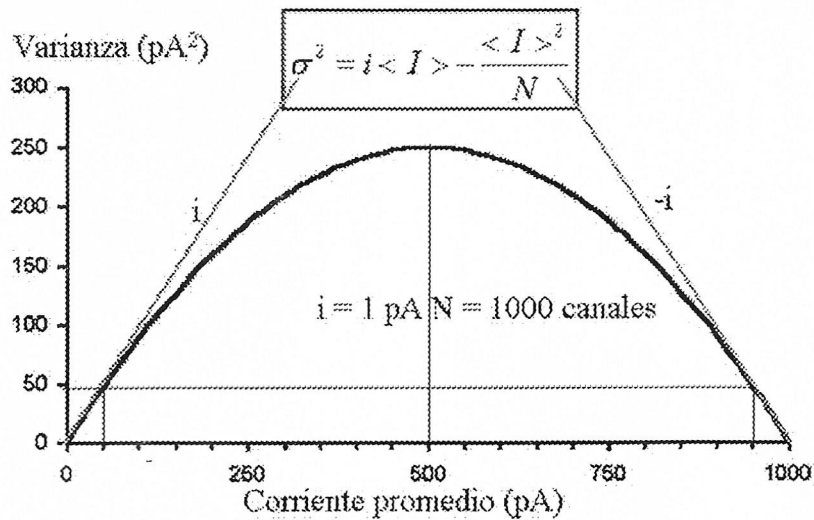


Figura 2A. Relación varianza vs corriente promedio para una población de 1000 canales con corriente unitaria de 1pA y  $P_{\text{max}} = 1$ .

Si representamos gráficamente la relación entre la varianza y la corriente promedio, es evidente que estamos en presencia de una parábola que abre hacia abajo, con máximo en  $\langle I \rangle = iN/2$  y pendiente igual  $i$ .

Por último, una vez determinados los parámetros  $i$  y  $N$  a partir del mejor ajuste a la ecuación 3 de los puntos experimentales, se determina la  $P_{\text{max}}$  como:  $P_{\text{max}} = I_{\text{max}}/(iN)$  (ver más detalles en Álvarez y col., 2002).