

UCH-FC  
DOC-B  
012  
C1

CARACTERIZACION DEL SITIO DE UNION DE CALCIO  
DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO  
DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA

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

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

por

ANDRES OBERHAUSER BITTIG

Santiago, Junio de 1987

Profesores Patrocinantes:

Dr. Osvaldo Alvarez

Dr. Ramón Latorre



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado del candidato

Andrés Oberhauser Bittig

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 20 de Mayo de 1987.

Patrocinantes de Tesis

Dr. Osvaldo Alvarez .....

Dr. Ramón Latorre .....

Comisión informante de Tesis

Dr. Nibaldo Inestrosa .....

Dr. Enrique Jaimovich .....

Dr. Mario Luxoro .....

Dr. Benjamín Suárez .....



Para Marcela

por supuesto.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a Ramón Latorre por el cariño que siempre mostró durante la realización de esta tesis.

También mi especial agradecimiento a Osvaldo Alvarez, por su paciencia y dedicación.

Agradezco a Alfredo Villarroel, David Naranjo, Ricardo Delgado y Carmen Alcaayaga por ofrecerme su amistad.

Agradezco a Ximena Cecchi, Daniel Wolff, Cecilia Vergara, Juan Bacigalupo y Claudio Laurido, por ayudarme y apoyarme en muchas decisiones difíciles.

Agradezco a Anita Godoy, Juan Espinoza y Juan Valencia por su bondad y preocupación constantes.

Agradezco de todo corazón a mi familia entera: mi esposa Marcela, mis padres y hermanos, por su infinito amor sin el cual jamás habría realizado este trabajo.

Gran parte de esta tesis fué realizada con la ayuda de una beca del Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile y de una beca del Centro de Estudios Científicos de Santiago.



## INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCION	1
Teoría de selectividad iónica	1
Proteínas de membrana	6
Canales de potasio activados por calcio	7
Selectividad del sitio de unión de calcio	10
Incorporación del canal en bicapas artificiales	12
Cationes divalentes	13
Objetivos	15
MATERIALES Y METODOS	16
Materiales	16
Método experimental	16
Preparación de vesículas de túbulo transversal	17
Sistema de bicapas planas	18
Sistema de medición de corriente	20
Generador de pulsos	22
Soluciones	22
Lípidos	24
Formación de membranas	25

Incorporación de canales de TT a bicapas planas	26
Análisis de las corrientes	26
Visualización de los datos adquiridos	27
Programas de computación	27
Curvas de probabilidad de abertura-voltaje	28
Mediciones cinéticas	29
Cálculo de números de Hill	30
Secuencias de Eisenman	31
Protocolos	32
RESULTADOS	35
Selectividad del sitio que une calcio	35
Selectividad en la activación	36
Similitudes con la activación por calcio	42
Conclusión	46
Activación en presencia de calcio	45
Activación por $Mg^{2+}$ y $Ni^{2+}$	51
Conclusión	56
Bloqueo por cationes divalentes	57
Bloqueo de la corriente a través del canal	57
Disminución de $P_o$	62
Conclusión	64
DISCUSION	65
Un modelo para la selectividad de la activación	65
Activación en función del radio iónico	66
El modelo	69

Aplicación del modelo a	
los cationes alcalino-térreos	70
Aplicación del modelo al grupo IIA'	74
¿ Tienen sentido los parámetros	
estimados por el modelo ?	76
Predicción del grupo químico	78
Aplicación del modelo a todos los	
cationes divalentes	80
Cationes capaces de activar el canal	82
Cationes incapaces de activar el canal	84
$Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ y $Hg^{2+}$	84
Predicciones del modelo para otros cationes	85
Cationes trivalentes	85
Cationes monovalentes	86
Comparación con otros modelos	88
Troponina C	90
Ubicación física del receptor	
para $Ca^{2+}$ en el canal	92
Comparación con otros canales de	
potasio activados por calcio	93
Conclusión general	96
Activación en presencia de calcio	98
Mecanismos posibles para la	
activación por $Mg^{2+}$ y $Ni^{2+}$	98
¿ Porqué aumenta $N_H$ al aumentar la $[X^{2+}]$ ?	102

Consecuencia mecanicista del aumento de $N_w$ inducido por $X^{2+}$	102
Modelo para la activación por $Mg^{2+}$	104
Características del sitio 'M'	104
Comparación con otras proteínas que ligan $Ca^{2+}$	105
Rol fisiológico del $Mg^{2+}$	106
APENDICE A	108
APENDICE B	116
REFERENCIAS	120

## LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Activación del canal de $K^+$ activado por $Ca^{2+}$ , por cationes divalentes en ausencia de $Ca^{2+}$ .	39
Tabla II.	Números de Hill para la activación por $Ca^{2+}$ , en presencia de cationes divalentes.	55
Tabla III.	Bloqueo de cinética rápida para cationes divalentes.	61
Tabla IV.	Radio de los dos grupos aniónicos ( $r_s$ ) en función del espaciamento (D).	73
Tabla V.	Predicción de las secuencias de selectividad para la unión de cationes divalentes a grupos aniónicos.	113
Tabla VI.	Radios iónicos y energías de hidratación.	115

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Dependencia de la concentración de calcio y del potencial eléctrico del canal de $K^+$ activado por $Ca^{2+}$ .	9
Figura 2.	Cationes divalentes.	14
Figura 3.	Sistema de bicapas planas.	19
Figura 4.	Sistema de medición de corriente.	21
Figura 5.	Generador de pulsos.	23
Figura 6.	Activación del canal por cationes divalentes.	37
Figura 7.	$P_o$ en función del voltaje.	40
Figura 8.	$P_o$ en función de la concentración de $X^{2+}$ .	41
Figura 9.	Gráficos de Hill para la activación por cationes divalentes.	43
Figura 10.	Activación por cationes divalentes en presencia de calcio.	46
Figura 11.	$P_o$ en función del voltaje, para la activación por $X^{2+}$ en presencia de $Ca^{2+}$ .	48
Figura 12.	$P_o$ en función de la $[Ca^{2+}]$ en presencia de $X^{2+}$ .	49
Figura 13.	Activación por $Mg^{2+}$ .	52
Figura 14.	Bloqueo de la corriente a través del canal inducido por cationes trivalentes.	59

Figura 15. Bloqueo dependiente de voltaje inducido por cationes trivalentes.	60
Figura 16. Efecto de los cationes $Zn^{2+}$ y $Pb^{2+}$ .	63
Figura 17. Activación en función del radio iónico.	67
Figura 18. Energía de unión entre los diferentes cationes divalentes alcalino-térreos y dos sitios hipotéticos de carga -1, referida al $Ca^{2+}$ .	72
Figura 19. Energía de unión entre los diferentes cationes divalentes del grupo IIA' y dos sitios hipotéticos de carga -1, referida al $Cd^{2+}$ .	75
Figura 20. Predicción del modelo para todos los cationes divalentes estudiados.	81
Figura 21. Efecto de la variación de las constantes de afinidad de los sitios de unión de $Ca^{2+}$ .	100

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	angstrom ( $10^{-10}$ m)
D	distancia entre grupos aniónicos
EGTA	ácido etilenglicol bis-(2-aminoetil)tetraacético
$\mu$ M	micromolar
MOPS	ácido 3-(-N-morfolinolpropanosulfónico)
MOPS-KOH, pHx	solucion de MOPS que se le agrega KOH hasta pHx
PE	fosfatidiletanolamina
PC	fosfatidilcolina
P <sub>o</sub>	fracción del tiempo que el canal permanece en el estado abierto
r <sub>s</sub>	radio del grupo aniónico
r <sub>x</sub>	radio del catión divalente
S <sup>2-</sup>	sitio aniónico divalente
TT	túbulo transversal
TRIS	(hidroximetil) amino-metano
Tris-maleato, pHx	solución de TRIS que se le agrega maleato de TRIS hasta pHx
$\Delta$ U	cambio de energia libre

v	potencial eléctrico aplicado a través de la membrana (volts)
X <sup>2+</sup>	catión divalente
δ	distancia eléctrica
z	valencia del ión

## RESUMEN

El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de músculo esquelético es una proteína de membrana, cuya actividad depende de la  $[Ca^{2+}]$  intracelular y del potencial eléctrico a través de la membrana. En este canal se desconocen las características del sitio que liga calcio. Con el objetivo de determinar algunas propiedades fisicoquímicas de este sitio, se estudió el canal incorporado en bicapas artificiales de fosfolípidos. Usando esta técnica se determinó la secuencia de afinidad del canal para una serie de cationes divalentes, mediante la determinación de la capacidad de estos iones de activar el canal.

Se encontraron varios cationes divalentes capaces de activar el canal. La secuencia de afinidad del sitio que une  $Ca^{2+}$  en esta proteína es,  $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$ , y la efectividad relativa es, respectivamente, 1:  $1 \times 10^{-2}$  :  $1,6 \times 10^{-3}$  :  $1 \times 10^{-5}$  :  $3 \times 10^{-6}$  :  $2 \times 10^{-6}$ .

El proceso de activación es idéntico al inducido por  $Ca^{2+}$  (dependencia al voltaje, dependencia a la concentración de catión activador, cinética de abertura y cierre). También se encontraron cationes divalentes incapaces de activar el canal.

Con base en estos resultados se construyó un modelo para el sitio de ligamen de  $\text{Ca}^{2+}$ , basado solamente en interacciones electroestáticas entre los cationes divalentes y grupos de unión. Se encontró que el modelo que mejor describe los resultados, contiene dos grupos de ligamen de radio 0,06 nm y espaciados en 0,20 nm.

Este modelo da cuenta de la secuencia de afinidad para los cationes divalentes que pertenecen a una misma familia química. Sin embargo, el modelo es incapaz de predecir la secuencia de afinidad experimental para todos los cationes divalentes estudiados. Es necesario considerar otras contribuciones, como el aumento del número de Hill inducido por algunos cationes divalentes, e interacciones no-electroestáticas entre los cationes divalentes y los sitios aniónicos.

A partir de consideraciones de la química de algunos cationes divalentes en solución acuosa y, de las similitudes fisicoquímicas del sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de ésta proteína con el de otras proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (troponina C, calmodulina), se postula que los grupos químicos que participan en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  son carboxilos (de residuos de ácido aspártico y glutámico) y carbonilos (del enlace peptídico).

Los resultados para la activación del canal por cationes divalentes en presencia de calcio, sugieren la existencia de un sitio alostérico en el canal accesible por el lado citoplasmático. La unión de algunos cationes divalentes (como  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ ) a este sitio produciría el desenmascaramiento de nuevos sitios específicos para  $Ca^{2+}$ .

## ABSTRACT

The  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channel from skeletal muscle is a membrane protein whose activity depends on the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels and the electric potential across the membrane. The characteristics of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of this channel are unknown. In order to establish some structural properties of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site, the channel was incorporated into planar lipid bilayers, and its activation by a series of divalent cations was studied.

In the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the solution several divalent cations can activate this channel. The binding sequence for divalent cations of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site is:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ , and the relative efficacies are:  $1 : 1 \times 10^{-3} : 1,6 \times 10^{-5} : 1 \times 10^{-5} : 3 \times 10^{-6} : 2 \times 10^{-6}$ .

The activation process is identical to that induced by  $\text{Ca}^{2+}$  ions (voltage dependence, concentration dependence of the activating cation, open/closure kinetics). The ions:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  cannot activate the channel.

A model of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site is considered in which divalent cation selectivity is determined primarily by

electrostatic interactions between the binding site and the different cations. The site is envisaged as consisting of two binding sites (radius 0,06 nm) with a separation of 0,20 nm between them.

The selectivity sequences predicted by the model for the the alkaline earth cations and the divalent cations of the IIA' group are in agreement with the selectivity sequences observed for the channel activation. However, the model is unable to predict satisfactorily the selectivity sequence observed for all the divalent cations studied (both alkaline earth cations and transition metals). It is necessary to consider other contributions, such as the increase in the Hill coefficient induced by some divalent cations, and nonelectrostatic interactions between the binding sites and the different cations.

Taking into account the chemistry of some divalent cations in aqueous solution and the similarities between the  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of this channel and of other  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins (troponin C, calmodulin), it can be proposed that the anionic sites that participate in the binding of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, are carboxyl (aspartic and glutamic residues) and carbonyl (peptidic bond) groups.

The results obtained for the activation of the channel by divalent cations in the presence of calcium in the solution, suggest the existence of an allosteric site accessible from the cytoplasmatic side of this membrane protein. The site controls the cooperativity of the  $\text{Ca}^{2+}$  activation, revealing  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites already present after the binding of the modulator ion (for example,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ).

## INTRODUCCION

Esta tesis trata sobre un estudio de la selectividad del sitio de unión de calcio en una proteína de membrana.

Teoría de selectividad iónica.

En 1962 George Eisenman desarrolló una teoría de selectividad de membranas basada en las constantes de asociación de los cationes alcalinos a sitios aniónicos fijos (Eisenman, 1962). Eisenman evaluó estas constantes de asociación estimando la energía necesaria para deshidratar un catión y ubicarlo en estrecho contacto con un anión esférico, que representa el sitio fijo en la membrana. Eisenman calculó esta energía en función del radio del sitio. Los cambios de energía los calculó teóricamente a partir de las energías de deshidratación del catión y de las atracciones electrostáticas entre el catión deshidratado y el sitio aniónico. Para la unión de los 5 cationes alcalinos encontró que, de todas las secuencias imaginables (120 en total) sólo 11 pueden surgir de esta teoría y comprobó que son las únicas que se encuentran experimentalmente. Para aniones de gran radio iónico (sitio que genera un campo



con separación  $D$ . Los residuos de aminoácidos que originan el sitio parecen provenir de los ácidos aspártico y glutámico, tirosina y serina.

De hecho, Einspahr y Bugg (1977) concluyen (de acuerdo a datos cristalográficos, espectroscópicos y químicos de 60 estructuras cristalinas) que los ligandos más comunes que participan en la unión de calcio a proteínas son los grupos carbonilos (enlace peptídico) y grupos carboxilos (de residuos ácidos aspártico y glutámico).

En este caso la energía total de unión dependerá de la distancia entre los sitios,  $D$ , y del radio de los sitios,  $r_s$  (ver Apéndice A, para más detalle). Según Truesdell y Christ (1967), la energía de interacción depende más fuertemente de  $D$  que de  $r_s$ . Por lo tanto en este modelo la selectividad dependerá no sólo de la "fuerza de campo" del sitio sino también de la accesibilidad estérica del ión. Usando este tratamiento, Eisenman (1963) y Truesdell y Christ (1967) llegan independientemente a las conclusiones siguientes:

1. La afinidad relativa de un sitio por cationes monovalentes o divalentes depende críticamente de la distancia entre sitios ( $D$ ): los sitios muy espaciados tienen más afinidad por los cationes monovalentes que por los divalentes.

2. La secuencia de selectividad es independiente de la hidratación del sitio, es decir, del número de moléculas de

agua en la vecindad de los sitios aniónicos.

3. Se predicen 7 secuencias probables (de las 24 permutaciones posibles) de los cationes alcalino-térreos. Por ejemplo, si el espaciamiento entre ambos sitios aniónicos es de 0,20 nm, las diferentes secuencias son (Apéndice A):

- I Mg > Ca > Sr > Ba
- II Ca > Mg > Sr > Ba
- III Ca > Sr > Mg > Ba
- IV Ca > Sr > Ba > Mg
- V Ca > Ba > Sr > Mg
- VI Ba > Ca > Sr > Mg
- VII Ba > Sr > Ca > Mg

La secuencia VII, en que la energía libre de hidratación domina el intercambio, se presenta en sitios "débiles" o de gran radio iónico (sitios con baja densidad de líneas de fuerza); en cambio la secuencia I en que se prefiere al ión con el menor radio iónico, se presenta en sitios "fuertes", donde las interacciones ión-sitio son más fuertes que las energías libres de hidratación.

Es importante notar que, en este tratamiento no se consideran interacciones débiles, ni cambios entrópicos.

De lo anterior se desprende que, las diferentes secuencias de afinidad para los diferentes cationes alcalino-térreos que pueden surgir de un modelo que consiste

en un par de sitios aniónicos hipotéticos, depende del espaciamiento,  $D$ , y del radio de éstos,  $r_s$  (ver apéndice A). Por lo tanto, conociendo la secuencia de afinidad y usando las ecuaciones 5 y 6 (apéndice A) es posible estimar el valor de los parámetros estructurales,  $D$  y  $r_s$ .

Por ejemplo, la secuencia de selectividad para la troponina C (subunidad receptora de  $Ca^{2+}$  de la troponina) por cationes divalentes alcalino-térreos corresponde a la secuencia IV, es decir, el sitio de unión de  $Ca^{2+}$  contendría ligandos capaces de generar un campo eléctrico de fuerza de campo intermedio. Esto implica que el valor de los parámetros estructurales en un modelo electrostático que consiste en dos aniones, es:  $D = 0,21$  nm y  $r_s = 0,07$  nm (ver tabla V, apéndice A). Un modelo que consiste en una sola carga negativa, no genera la secuencia observada (para cualquier valor de  $r_s$ ).

En esta tesis se usará este tratamiento teórico para caracterizar, desde este punto de vista, el sitio de unión de  $Ca^{2+}$  de una proteína de membrana, cuya actividad fisiológica está modulada por iones calcio: un canal de potasio activado por calcio.

### Proteínas de membrana.

La estructura común a todas las membranas biológicas es de una doble capa de lípidos, cuya continuidad es interrumpida por moléculas de proteínas (modelo de Singer y Nicolson, 1972). La bicapa de lípidos constituye una gran barrera para el paso de iones y la permeabilidad iónica de la membrana celular reside en una clase de proteínas integrales que atraviesan la bicapa de lípidos. En particular, una subclase de las proteínas integrales se denominan como canales iónicos. Estas proteínas fluctúan entre conformaciones conductoras a iones (estados abiertos) y no conductoras (estados cerrados). Se denomina activación al proceso de abertura de canales. Los estímulos principales que participan en la activación de canales iónicos son eléctricos (diferencia de potencial eléctrico presente a través de la membrana) y químicos (hormonas, neurotransmisores, calcio, nucleótidos cíclicos, etc). Por ejemplo, para el receptor de acetilcolina la activación del canal depende de una señal química (acetilcolina) y del voltaje, por lo cual se dice que este canal es dependiente del potencial eléctrico y activado por acetilcolina. Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del axón son dependientes de la diferencia de potencial eléctrico establecida a través de la membrana.

**Canales de potasio activados por calcio.**

En muchos tipos de células un aumento de la concentración intracelular de calcio produce un aumento en la conductancia al potasio. Este efecto lo encontramos en células nerviosas de vertebrados (Meech, 1978), células secretoras (Petersen y Maruyama 1984), eritrocitos (Gárdos, 1958), células musculares (Meech, 1978) y en células nerviosas de invertebrados (Meech, 1978).

Usando técnicas que permiten observar la actividad de canales individuales ya sea en células ("patch-clamp") o en sistemas artificiales (bicapas planas), se ha encontrado que este efecto es mediado por canales de potasio activados por calcio. Estos canales se han encontrado en neuronas simpáticas de algunos vertebrados (Adams y col, 1982), células cromafines de bovino (Marty, 1981), células  $\beta$  del páncreas (Cook y col, 1984), mioesferas de rata (Magleby y Pallota, 1983), sarcolema del músculo liso del conejo (Cecchi y col, 1986), túbulos transversales de músculo esquelético de rata y conejo (Moczydlowski y Latorre, 1983a; Vergara y Latorre, 1983) y en neuronas del caracol (Lux y col, 1981). Todos estos canales son activados por el  $Ca^{2+}$  intracelular, pero la conductancia unitaria, selectividad de la conducción de cationes y activación por potencial eléctrico es altamente variable (Latorre, 1986). Los canales

de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  estudiados en sistemas artificiales (bicapas planas), presentan las mismas características de activación por potencial eléctrico y  $[Ca^{2+}]$  que los estudiados en las células de las cuales se aislaron.

Aún no está claro el rol fisiológico que cumplen los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ . Es probable que participen en la generación del potencial de acción en varios tipos de células, como en células cromafines (Marty, 1981)), en la actividad repetitiva en neuronas (Gorman y col, 1981) en la actividad cíclica en el músculo liso (Singer y Walsh, 1984) o en la secreción (Petersen y Maruyama, 1984).

Los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  han sido caracterizados en cuanto a la conducción iónica (Vergara, 1983; Villarroel, 1986; Yellen, 1984; Cecchi y col, 1986) y las características de la cinética de abertura y cierre (Mocdzydowski y Latorre, 1983a; Methfessel y Boehm, 1982; Magleby y Pallota, 1983). Vergara (1983), estudiando el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de túbulo transversal (TT) de músculo esquelético de rata, encontró que la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto,  $P_o$ , es una función sigmoidea de la diferencia de potencial eléctrico establecido a través de la membrana (V), (figura 1B). Esta fracción aumenta a medida que se hace más positivo el lado citoplasmático (figura 1A y 1B).

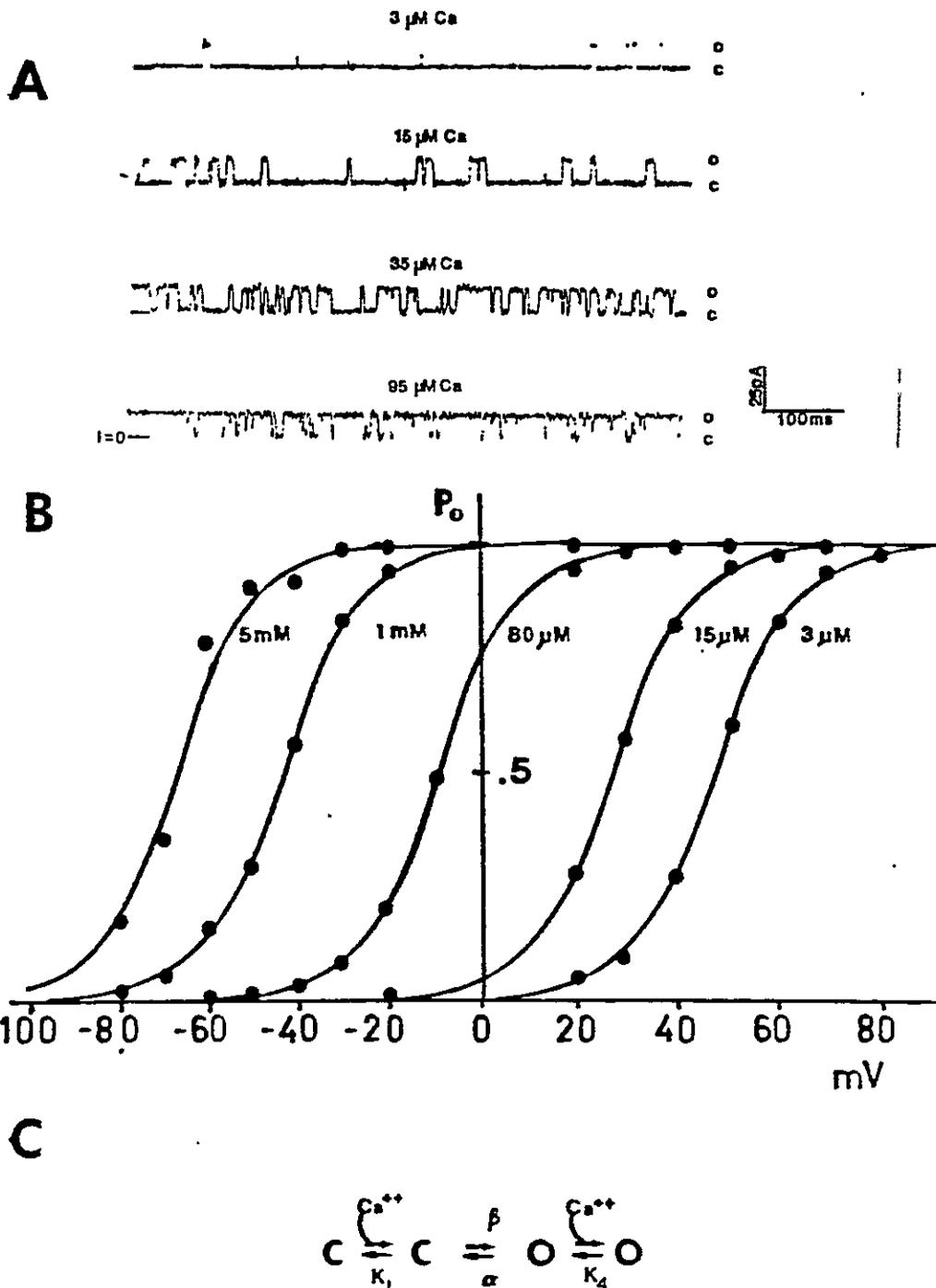


Figura 1

Dependencia de la concentración de calcio (en lado citoplasmático) y potencial de membrana del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de TT de músculo esquelético de rata.

A) Fluctuaciones de corriente en una membrana de fosfatidiletanolamina en 0,2 M KCl simétrico. O= estado abierto, C= estado cerrado (adaptado de Vergara, 1983). B) Gráfico de la fracción del tiempo que el canal permanece en el estado abierto,  $P_o$ , en función del potencial de membrana, a distintas concentraciones de calcio en el lado citoplasmático. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas continuas a lo que predice una distribución de Boltzmann para  $P_o$ . C) Modelo cinético deducido por Moczydlowski y Latorre (1983) con base en el efecto de la concentración de calcio sobre los tiempos medios de apertura y cierre del canal.

Por otra parte, la curva  $P_o$  en función de  $V$ , se desplaza hacia potenciales más negativos a medida que se aumenta la concentración de calcio en el lado citoplasmático (figura 1B), pero no es afectada por el calcio extracelular. Al construir gráficos de Hill de  $P_o$  en función de la concentración de calcio, se demuestra que en el proceso de abertura del canal participan a lo menos dos iones calcio. El esquema cinético que describe la activación del canal se muestra en la figura 1C: se une un  $Ca^{2+}$  en el estado cerrado lo que hace posible la transición al estado abierto, y luego se une otro  $Ca^{2+}$  en el estado abierto favoreciendo la permanencia en este estado.

#### Selectividad del sitio de unión de calcio.

Se ha estudiado muy poco respecto a la activación del canal por iones divalentes. Sin embargo, existen algunas indicaciones de que este canal es activado específicamente por iones  $Ca^{2+}$ . Estas son:

- 1.- Gorman y Hermann (1979) estudiaron la efectividad de diversos cationes divalentes para activar las corrientes macroscópicas de  $K^+$  moduladas por iones  $Ca^{2+}$ , en neuronas de Aplysia. Al comparar las corrientes inducidas por inyecciones electroforéticas de distintos cationes divalentes, encontraron que el  $Ca^{2+}$  es el catión activador

más efectivo, cuando se lo compara con  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ . Los iones  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  no activan el canal. La efectividad del catión divalente para activar el canal parece estar relacionada con el radio iónico: sólo los iones cuyo radio está comprendido entre 0,076 y 0,113 nm activan el canal.

2.- Meech (1980), encontró activación por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  en neuronas de Helix aspersa, usando la misma técnica.

La dificultad principal en la interpretación de estos resultados radica en que no es fácil medir la concentración libre del catión divalente en el interior de la célula (Blinks y col, 1982). Existen resultados (Brinley y col, 1977) que permiten concluir que la mayor parte del calcio inyectado es ligado por moléculas presentes en el citoplasma, como por ejemplo proteínas que unen calcio (tropomiosina, troponina C, calmodulina, parvalbúmina), o extraído del compartimiento citoplasmático por diversos sistemas de transporte (canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, intercambiadores de  $\text{Na}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  y "uniporters" de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en las mitocondrias), (Carafoli y Pennitson, 1985). Por otra parte es posible que los otros cationes divalentes, provoquen un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, al ligarse a los tampones citoplasmáticos, desplazando a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Estas dificultades pueden superarse si se tiene el canal en un sistema libre de células, como por ejemplo incorporado en bicapas de lípidos.

#### Incorporación del canal en bicapas artificiales.

El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  puede ser incorporado en bicapas artificiales de fosfolípidos, por fusión de vesículas de membrana de TT de rata. Así es posible estudiar la selectividad del sitio que une calcio, teniendo el control de la concentración de electrolitos, temperatura, composición de la membrana.

Usando el canal incorporado a bicapas, Latorre y col. (1982), han demostrado que, en presencia de concentraciones de  $Ca^{2+}$  del orden de  $\sim 5\mu M$ , el  $Cd^{2+}$  activa y el  $Mg^{2+}$  y el  $Ba^{2+}$  no activan el canal. En ausencia de calcio en la solución ( $< 25nM$ ), ni el  $Mg^{2+}$  ni el  $Ba^{2+}$  activan el canal. El ión  $Ba^{2+}$ , no sólo es incapaz de activar el canal sino que lo bloquea (Vergara y Latorre, 1983). El  $Ca^{2+}$  a concentraciones milimolares también es capaz de inducir el mismo tipo de bloqueo.

En esta tesis se hará un estudio de la activación por diversos iones divalentes, del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de TT en bicapas de fosfolípidos. Se espera obtener estimaciones de las energías de ligamen de los distintos

iones divalentes, a partir de su capacidad de activar el canal. Se estudiará una serie amplia de cationes divalentes, con el objetivo de deducir algunas características estructurales de los sitios de  $\text{Ca}^{2+}$ , en este canal, usando la teoría de las constantes de asociación.

#### Cationes divalentes.

Los cationes divalentes usados en este trabajo corresponden, en la tabla periódica, al grupo IIA (alcalino-térreos) y al periodo 4 y grupo IIA' (metales de transición) (figura 2a). Los parámetros que se varían son, principalmente, el radio iónico y la energía de hidratación. Para los cationes divalentes que pertenecen a un mismo grupo, se observa que existe una relación lineal entre ambos parámetros: los cationes divalentes de gran radio iónico tienen una pequeña energía de hidratación (figura 2b).

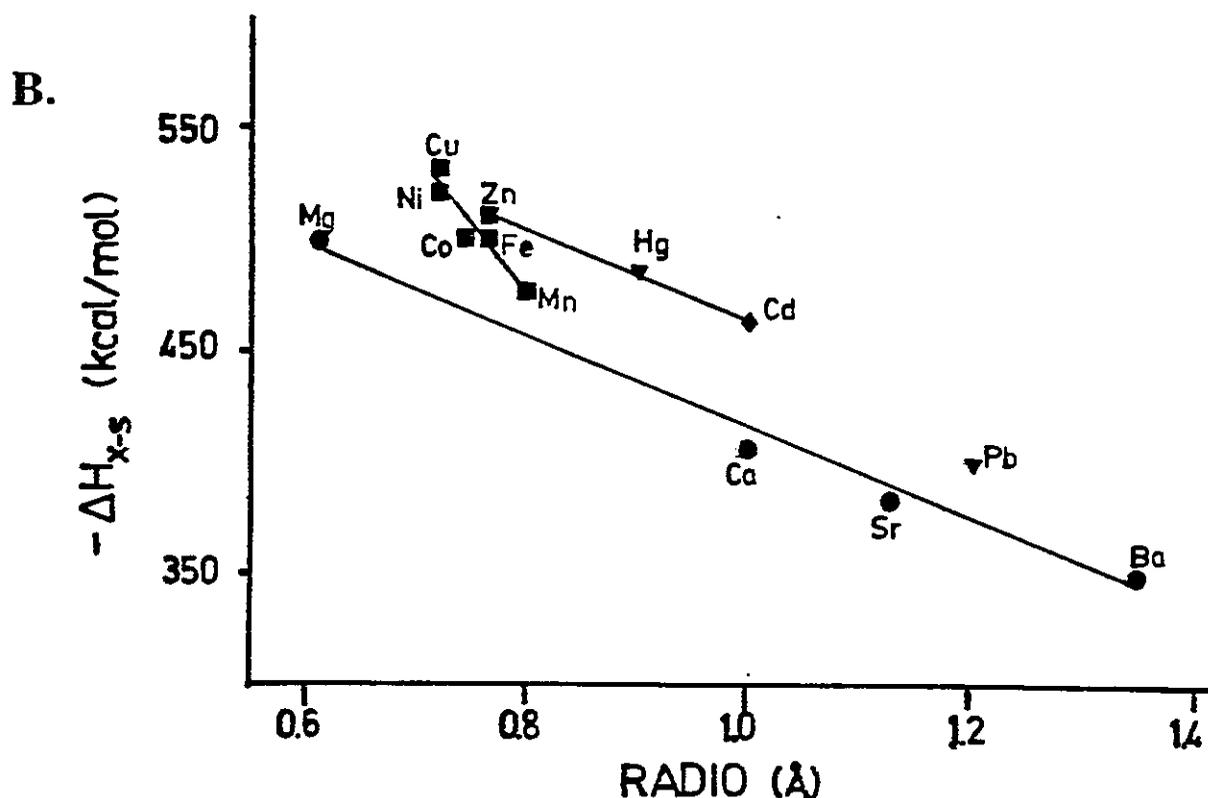
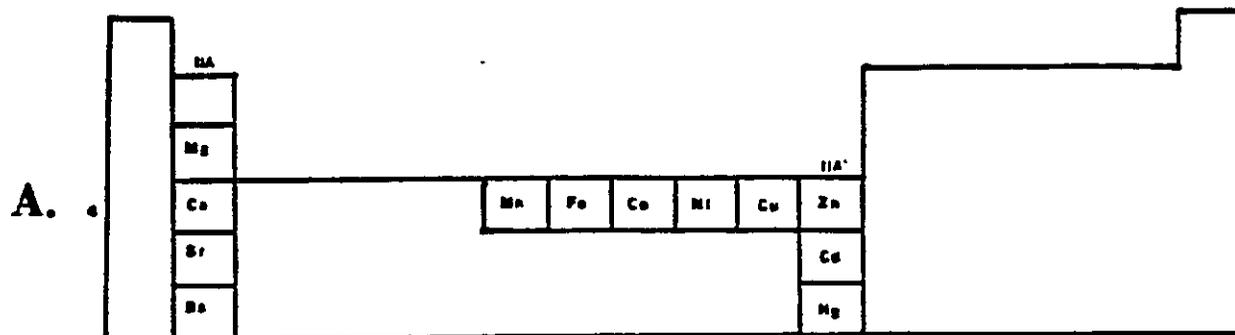


Figura 2  
Cationes divalentes.

A) Esquema de la tabla periódica, que muestra los cationes divalentes usados en este trabajo.

B) Energía de hidratación (entalpía liberada al llevar el catión de la fase gas a una solución acuosa) en función del radio iónico de Pauling, para una serie de cationes divalentes. La energía de hidratación disminuye a medida que aumenta el radio iónico (Adaptado de Conway, 1952 y 1981).

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

El canal de potasio activado por calcio es una proteína de membrana, en la cual se desconocen las características del sitio que liga calcio. El objetivo de esta tesis es estudiar las características del sitio de unión de calcio del canal de potasio activado por calcio, usando una técnica que permite estudiar el ligamen de iones a la proteína y tener el control de las concentraciones de electrolitos. Los objetivos específicos son los que se detallan a continuación:

- 1) Determinar la secuencia de afinidad del canal por una serie de cationes divalentes, mediante la determinación de la capacidad de estos iones de activar el canal.
  
- 2) Usar la teoría de selectividad iónica para explicar la secuencia encontrada, y para establecer algunas características fisicoquímicas del sitio que une calcio en esta proteína, como son, por ejemplo: accesibilidad estérica y características estructurales (p.ej. el radio iónico) de los grupos químicos que participarían en la unión de calcio.

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES

Salas - Grado 1 (Puratronic), Alfa Division, Ventron Corp. (Danvers, MA) o Merck (E. Merck, Darmstadt): KCl, KF, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, EuCl<sub>3</sub>, TbCl<sub>3</sub>.

Lípidos - PE y PC de Avanti Polar (Birmingham, AL); decano de Eastman Organic Chemicals (Rochester, NY).

## METODOS

## Método experimental

Esencialmente el método consiste en incorporar canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> en bicapas artificiales de fosfolípidos, fundiendo vesículas de membrana provenientes de túbulo transversal de músculo esquelético de rata, y estudiar la activación del canal por una serie de cationes divalentes. A continuación se detallan todos los pasos que se siguieron.

#### A) Preparación de vesículas de TT

Se preparan vesículas de túbulo transversal de músculo esquelético de rata adulta usando una simplificación (Moczydlowski y Latorre, 1983a) del método descrito en detalle por Roseblatt y col. (1981). Se disecaron músculos (~200 gr) de las patas posteriores y anteriores de seis ratas adultas, los que se homogenizaron en una juguera combinado con 4 volúmenes de una solución que contiene KCl 100 mM, Tris-maleato 20 mM, pH 7. Después de una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos (centrífuga Sorvall RC2-B usando un rotor GSA), se colectó el sobrenadante y se agregó cristales de KCl hasta obtener una concentración final de 600 mM, con el objetivo de solubilizar las proteínas contráctiles. Esta suspensión se centrifugó a 80.000 x g durante 60 minutos en una ultracentrífuga Beckman modelo L, usando rotor 30. El sedimento se resuspendió en 30 ml Sacarosa 250 mM, Tris-maleato 20 mM, pH 7, y centrifugó a 10.000 x g durante 60 minutos para separar las mitocondrias remanentes. El sobrenadante se centrifugó en una gradiente discontinua de sacarosa a 80.000 x g durante 12 horas, en un rotor SW 27. La gradiente consistió en 3 capas de solución de sacarosa de concentración 25%, 27,5% y 35,2% (p/v) respectivamente. Se recogió la fracción que sedimentó entre las capas de 25% y 27,5%, y se repartió en 2 tubos de centrifuga adaptables a un rotor 30. Estos se completaron con volúmenes iguales de Tris-

un rotor 30. Estos se completaron con volúmenes iguales de Tris-maleato 20 mM pH 7, y se centrifugaron a  $80.000 \times g$  durante 60 minutos. El sedimento se resuspendió en 2 ml de 300 mM sacarosa Tris-maleato 20 mM pH 7, se dividió en pequeñas fracciones, se congeló usando una mezcla hielo seco-acetona y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser usados posteriormente. Todos los procedimientos se realizaron entre  $0-4^{\circ}\text{C}$  (en una cámara fría).

#### B) Sistema de bicapas planas

El sistema de membranas artificiales se muestra esquemáticamente en la figura 3. Este consiste en un bloque de polivinil-cloruro (PVC) en el cual se han practicado dos perforaciones cilíndricas de  $\sim 2$  cm en diámetro. Las paredes de estas dos cavidades se cruzan entre sí. En una cavidad se coloca un vaso de plástico (poliestireno) con un sector de la pared limado y perforado, definiendo dos compartimientos: uno es el interior del vaso y otro es el exterior. Además se han practicado dos perforaciones más pequeñas, las cuales se llenan con una solución saturada de KCl que se conecta a los compartimientos principales mediante puentes de agar-KCl. Mediante un par de electrodos reversibles de Ag/AgCl se conecta un lado de la cámara a un generador de funciones (lado CIS) y el otro lado a un conversor corriente-voltaje, que mantiene a potencial cero este lado de la cámara (lado

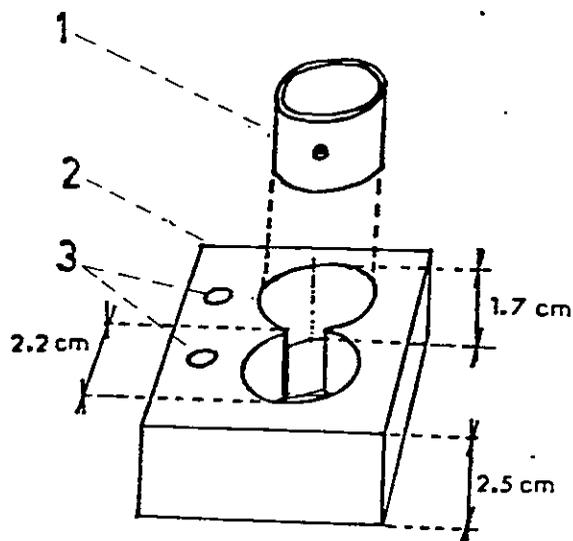
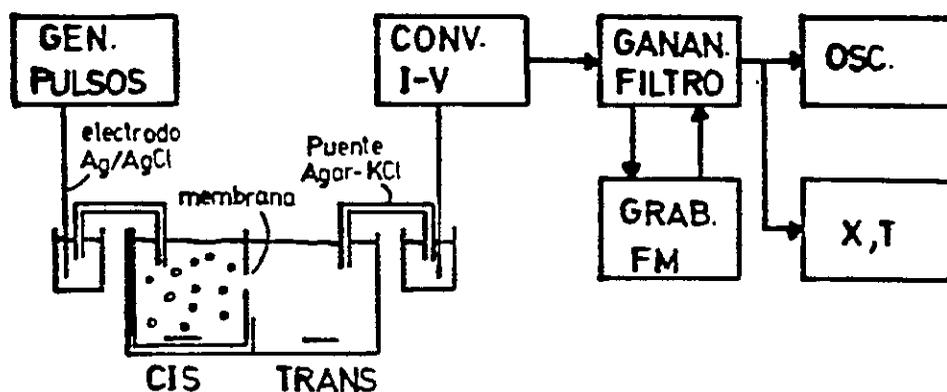


Figura 3

## Sistema de bicapas planas.

A) Representación esquemática de la cámara de bicapas y del sistema de medición de corrientes. El compartimiento CIS se conecta a un generador de funciones para el control del potencial de membrana. El lado TRANS (tierra virtual) se conecta a un convertidor corriente-voltaje. La salida de este circuito se conecta a un circuito que amplifica y filtra la señal. La corriente se visualiza en un osciloscopio y se almacena en una grabadora FM para análisis posterior.

B) Cámara de bicapas artificiales con copa y electrodos. 1) Copa de plástico con agujero central en que se "pinta" la membrana. 2) Bloque de PVC con cuatro perforaciones cilíndricas. 3) Perforaciones para insertar electrodos. La capacidad de cada compartimiento es de 3 ml (adaptado de Alvarez, 1985).

TRANS). Con este par de electrodos es posible fijar la diferencia de potencial y registrar la corriente que circula a través de la membrana. El conversor produce un potencial a su salida (V.) proporcional a la corriente que pasa por la membrana, con una sensibilidad de 1 nA/V. La salida del conversor es amplificada, observada en un osciloscopio y registrada, usando modulación de frecuencia, en una grabadora de cinta magnética (Lockheed 4D 4714).

Con el objetivo de evitar interferencias eléctricas todo este sistema se puso dentro de una caja de aluminio conectada a tierra (que actúa como jaula de Faraday). Debajo de esta caja hay dos motores eléctricos que hacen girar sendos imanes en su vástago, que permiten agitar las soluciones con pequeños imanes cubiertos de teflón colocados dentro de ambos compartimientos de la cámara.

Para evitar vibraciones mecánicas se colocó la caja de aluminio sobre un bloque de granito soportado por tres neumáticos de automóvil.

#### C) Sistema de medición de corriente (fig. 4)

El conversor corriente-voltaje consiste en un amplificador operacional con una resistencia de retroalimentación ( $10^9 \Omega$ ). Sigue un amplificador de ganancias 10x, 20x y 50x, y un filtro RC (con el objeto de reducir las altas frecuencias). A continuación un circuito compensador

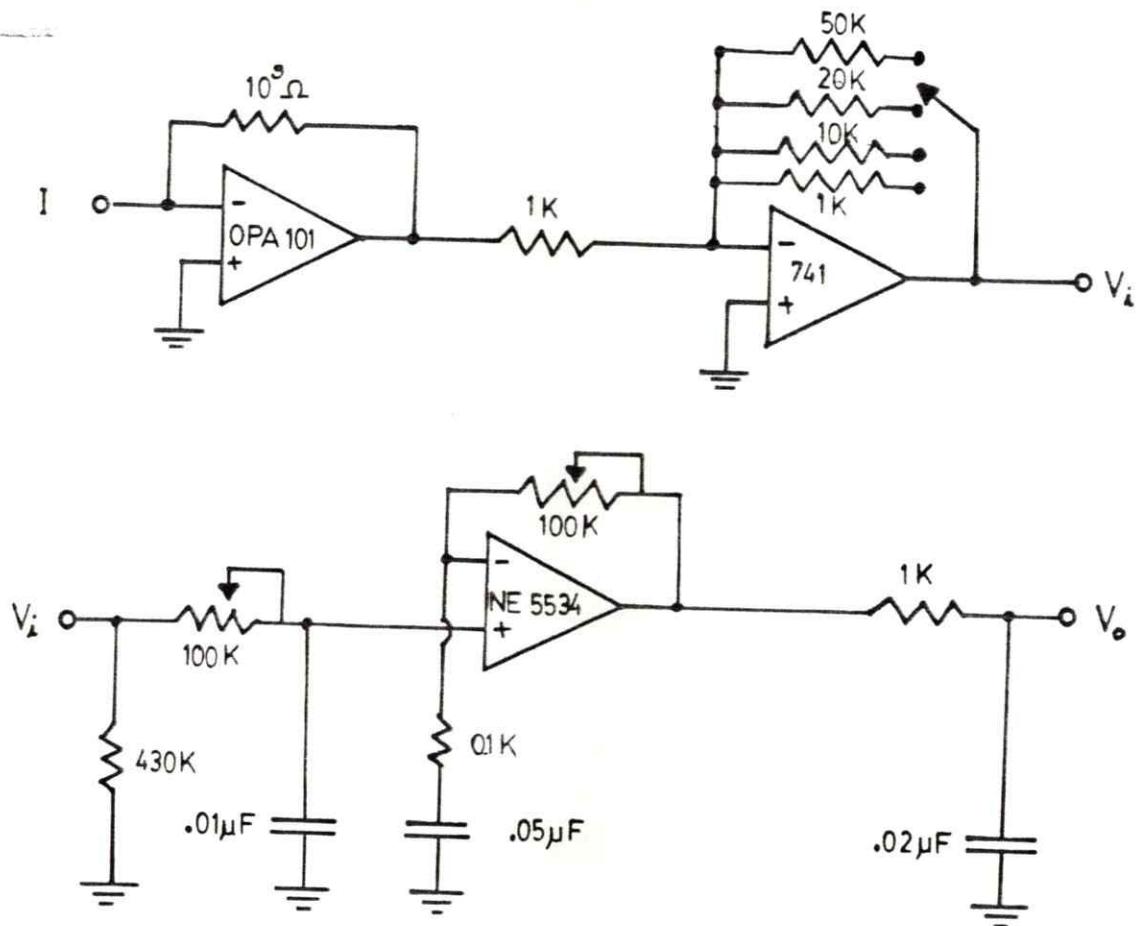


Figura 4  
Sistema de medición de corrientes.

El conversor consta de un amplificador operacional en configuración de conversor corriente-voltaje (OPA 101), con resistencia de retroalimentación de  $10^9 \Omega$ . El siguiente amplificador invierte la señal y la amplifica por 10, 20 y 50. Sigue un filtro RC ( $100 \text{ K}\Omega$ ,  $0.01 \mu\text{F}$ ), y un compensador de frecuencias ( $\text{NE } 5534$ ).

de frecuencias (con el objeto de aumentar la rapidez de respuesta de tiempo del sistema, hasta obtener una constante de tiempo de 250  $\mu$ s). Esta señal se registró en una grabadora FM (Lockheed 4714) a 7 1/2 in/s (2,5 kHz) o a 15 in/s (5 kHz), dependiendo de la resolución temporal requerida. Se construyó además un filtro activo de 2 polos que permite eliminar el exceso de altas frecuencias a fin de mejorar la relación señal/ruido.

#### D) Generador de pulsos (fig. 5)

Se construyó un generador de funciones con dos modalidades de funcionamiento: generador de pulsos rectangulares o triangulares, para estimar la capacidad de la membrana, y de niveles constantes de potencial, para establecer una diferencia de potencial constante a través de la membrana.

#### E) Soluciones

Todas las sales usadas fueron de grado 1 (ultrapuras), con el objeto de evitar la contaminación con cationes divalentes distintos a los usados. Las soluciones de cationes divalentes se prepararon en el momento de ser usadas. Las soluciones de KCl y KF se prepararon una vez por semana, diluyendo una solución 'stock' 1 M, en agua bidestilada.

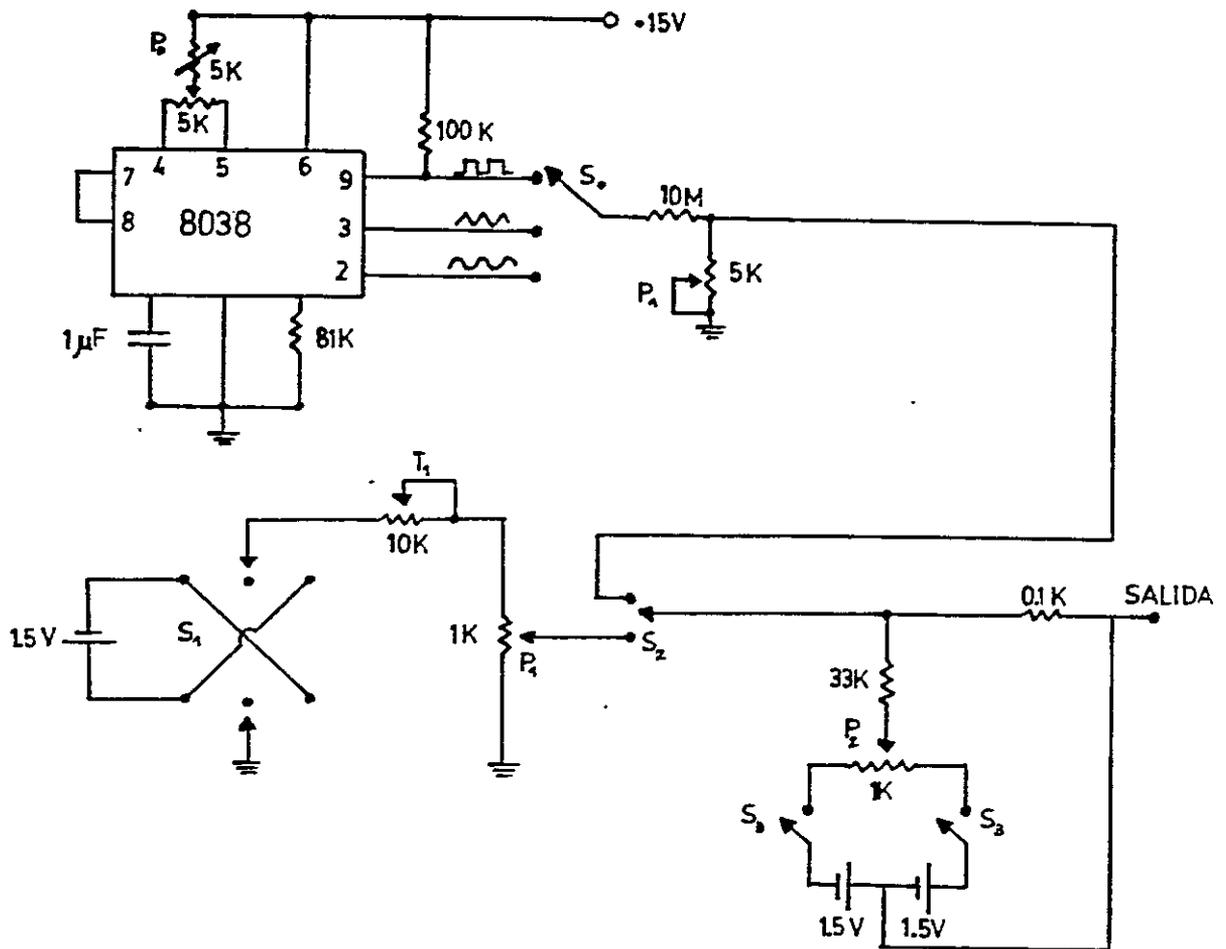


Figura 5  
Generador de pulsos

Los pulsos rectangulares se generan en un generador de funciones (8038). El potenciómetro  $P_0$  permite regular la frecuencia (50-150 Hz) y el potenciómetro  $P_1$  permite regular la amplitud de los pulsos. El interruptor  $S_0$  permite seleccionar entre las diferentes funciones. Una pila de 1.5 volt genera niveles de potencial, cuya amplitud máxima se ajusta con  $T_1$ . El interruptor  $S_1$  permite cambiar el signo del potencial. Dos pilas de 1.5 volts permiten adicionar un potencial cuya magnitud se regula con  $P_2$ , al conectar el interruptor  $S_3$ . El interruptor  $S_2$  permite escoger entre pulsos o niveles de potencial.

Debido a que en la mayoría de los experimentos fué indispensable conocer la concentración de calcio en las soluciones con la mayor exactitud, se determinó la concentración de calcio, proveniente de impurezas del KCl en una solución KCl 100 mM, MOPS-K<sup>+</sup> 5 mM, pH 7, usando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer/360). Se encontró que esta concentración es cercana al límite de resolución del aparato (0,08 ppm ó 2 µM) y fué en promedio 3 µM. Además se determinó la concentración de calcio, al agregar una cantidad conocida de CaCl<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O bidestilada. Esta concentración prácticamente no difiere de la calculada (la diferencia es cercana al 1%).

Además se determinó la concentración de calcio libre en algunas de las soluciones usadas, usando un electrodo de calcio (preparados y calibrados según el método de Alvarez-Leefmans y col, 1981 y Blinks y col, 1982). Se encontró que la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en una solución KCl 100 mM, MOPS-K<sup>+</sup> 5 mM, pH 7, fué en promedio de 1,5 µM y la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en una solución de KF 300 mM, MOPS-K<sup>+</sup> 5 mM, pH 7, fué de 3 nM. (Esta última medida no difiere mucho del valor teórico (0,8 nM)).

#### F) Lípidos

Los lípidos se mantuvieron en cloroformo a -20 °C. En el momento de ser usados, se tomó las cantidades necesarias, y se evaporó el cloroformo usando nitrógeno gaseoso. Para

evitar la incorporación de muchos canales a la bicapa, se usó una mezcla de fosfatidiletanolamina (PE)/fosfatidilcolina (PC) (4:1) a una concentración de 15 mg/ml en n-decano. Para obtener incorporación de varios canales se usó PE 15 mg/ml en n-decano.

#### G) Formación de membranas

Todos los experimentos se realizaron incorporando el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de TT en bicapas planas de fosfolípidos. Para ello, primero se forma la bicapa en la partición de poliestireno con una perforación central de 0,3 mm de diámetro. Ambos compartimientos se llenan con 3 ml de solución tampón MOPS 5 mM, pH 7. La membrana artificial se forma espontáneamente pintando el agujero (Mueller y col, 1963), usando un bastón de vidrio, con una mezcla de fosfatidiletanolamina (PE)/fosfatidilcolina (PC) (4:1), a una concentración de 15 mg/ml en n-decano. La formación de membranas se puede visualizar midiendo la capacidad eléctrica, que es proporcional al área de la bicapa ( 0.6  $\mu F/cm^2$ , Alvarez y Latorre, 1978). Al aplicar un pulso de potencial (1-10 mV) se produce una corriente capacitiva en los puntos en que la variación de potencial es máxima. La integral de esta corriente en el tiempo, es proporcional al cambio de voltaje y a la capacidad, y por tanto al área de la membrana. La conductancia basal de la membrana así formada se determinaba midiendo la corriente que circulaba a

través de ella al aplicar un potencial constante de +50 mV. Todos los experimentos se realizaron con membranas de 50 - 300 pF y con una conductancia basal inferior a 20 pS.

#### H) Incorporación de canales de TT a bicapas planas

Una vez hecha la bicapa, se agregaba la preparación de vesículas de TT en el lado CIS de la cámara (5-15  $\mu$ l). Previamente se agregaban 150  $\mu$ l de una solución KCl 3M, MOPS-KOH pH 7, para elevar la  $[K^+]$  a 150 mM y crear una diferencia de presión osmótica (lado CIS hiperosmótico), el cual se observó acelera la incorporación de canales (Latorre, 1986). Debido a la forma como se cierran las vesículas de esta preparación (casi el 100% de las vesículas tiene hacia adentro el lado extracelular de la membrana del TT; Hidalgo y col, 1985), siempre el lado citoplasmático del canal (lado sensible a la concentración de calcio) queda orientado hacia donde se agregaron las vesículas. En los sucesivos CIS alude al lado citoplasmático del canal, lado sensible al calcio y al lado del electrodo de potencial.

Manteniendo la agitación, se observó incorporación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  al cabo de 5 a 60 min. El o los canales se visualizaron observando las fluctuaciones de corriente al aplicar un potencial, generalmente +30 mV. Luego de la incorporación, se agregó KCl 3M en el lado TRANS para igualar las concentraciones a 150 mM CIS y TRANS.

### I) Analisis de corrientes

Para posterior análisis en computador, la señal eléctrica grabada en cinta magnética se filtró, amplificó y convirtió en digital y se grabó en una grabadora digital de 8 bits (Kennedy modelo 9700), que posee un conector que permite transferir los datos a la memoria de un computador (LOMAS S-100 PC).

#### Visualización de los datos adquiridos.

Los datos digitales transferidos a la memoria del computador, se visualizaron usando un osciloscopio con memoria digital (Nicolet 1070).

#### Programas de computación.

El registro de fluctuaciones de canal único se analizó usando:

- programas en lenguaje máquina, ASSEMBLER (diseñados por Osvaldo Alvarez) que permiten el control de la grabadora y el osciloscopio digital.

- programas en FORTRAN (diseñados en colaboración con David Naranjo), para analizar los registros de corriente.

Generalmente se analizaba un total de 32K puntos los que equivalen a 3, 6, 12 o 24 segundos del registro de fluctuaciones ya que el programa puede promediar N puntos de la cinta y guardarlos en un punto de la memoria (N puede ser 1, 2, 4, 8).

Curvas probabilidad de abertura-voltaje.

Se construyeron histogramas del número de veces que se obtiene cierta amplitud. La fracción del tiempo que el canal permanece en el estado abierto,  $P_o$ , se calculó a partir del número de puntos en el estado abierto dividido por el número total de puntos. La fracción de tiempo así calculada se graficó en función del voltaje. A través de los puntos experimentales se trazaron curvas de la distribución de Boltzmann para  $P_o$ , según un ajuste a la ecuación (ver derivación en Apéndice B):

$$P_o(V) = \{ 1 + \exp(-nF(V-V_o))/RT \}^{-1}, \quad (1)$$

en que  $V_o$  es el voltaje al cual  $P_o = 0,5$ , y  $n$  es el número de cargas ("gating particles") que se mueven en la membrana durante la transición abierto/cerrado,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  la constante universal del gas y  $T$  la temperatura. Se usó el método de ajuste no lineal de Gauss-Newton, modificado por Hartley (Chrisman y Tumolillo, 1969). El método da como resultado el parámetro y su desviación típica, junto con la suma de cuadrados. Los parámetros iniciales para  $n$  y  $V_o$  se estimaron a partir de una linealización de la ecuación 1.

### Mediciones cinéticas.

Las constantes cinéticas de abertura ( $\beta$ ) y cierre ( $\alpha$ ) (ver figura 1C), se estimaron a partir de los tiempos medios de abertura y cierre, según como se describe a continuación.

El tiempo medio que el canal permanece en cada estado de conductancia ( $\tau_n$ ) se calculó dividiendo el número de puntos en cada estado por el número de transiciones al estado abierto ( $m$ ). Si la cinética de abertura y cierre del canal puede describirse como un modelo de sólo dos estados, i.e., un estado cerrado y un estado abierto, se cumple que:

$$\tau_n = \left( \sum_{i=1}^n \tau_{n,i} \right) / m \quad (2)$$

Se construyeron histogramas de la distribución de duración en cada estado, es decir, del número de eventos que duran por lo menos un tiempo  $t$  en función de  $t$ . Puesto que el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ , en estado estable fluctúa entre varios estados abiertos y cerrados (Moczydlowski y Latorre, 1983, Magleby y Pallota 1983, Methefessel y Boheim 1982), estas funciones no son exponenciales simples (Ehrenstein y col, 1970) sino la suma de múltiples exponenciales. Moczydlowski y Latorre (1983) encontraron que, la etapa limitante en el proceso de abertura del canal, es la transición cerrado/abierto. Estos autores señalan que, para determinar las constantes cinéticas del proceso más

lento ( $\beta$ ,  $\alpha$ ), es necesario filtrar los registros a una frecuencia de 1 kHz. Por lo tanto, para mayor simplicidad, los registros de corriente se filtraron a 1 kHz y los histogramas de duración se ajustaron a exponenciales simples (usando el método de ajuste no lineal ya mencionado), de la forma:

$$F_a(t) = A \exp(-\alpha t), \quad (3)$$

$$F_c(t) = B \exp(-\beta t), \quad (4)$$

donde A y B corresponde al número de transiciones. Como parámetros iniciales se tomaron los tiempos medios de permanencia.

#### J) Cálculo de números de Hill

El número de Hill ( $N_H$ ) se calculó a partir de la relación (ver derivación en Apéndice B) :

$$\log (P_o / (1 - P_o)) = N_H \log [X^{e+}] + \log K, \quad (5)$$

(K es la constante de unión), en el rango en que  $P_o = 0,3 - 0,7$ .

Las curvas en los gráficos de  $P_o$  en función de  $[X^{e+}]$  se ajustaron a la ecuación (ver derivación en Apéndice B):

$$P_o = [X^{e+}]^{N_H} / (K_o + [X^{e+}]^{N_H}) \quad (6)$$

donde  $K_d$  es la constante de disociación para  $X^{2+}$ .

#### K) Secuencias de Eisenman.

Se simularon secuencias de Eisenman suponiendo dos modelos básicos:

i) interacción entre dos cargas (un anión y un catión divalente).

Variable = radio del anión.

ii) interacción entre tres cargas (dos aniones monovalentes y un catión divalente).

Variabes = radio de los aniones, distancia entre los aniones monovalentes.

El algoritmo para ambos casos es el siguiente: dado un conjunto de pares de radios y energías de hidratación para cationes divalentes en solución acuosa, se calculó la energía para el intercambio  $Ca^{2+} - X^{2+}$  ( $\Delta U_{c.-x}$ ) para una serie de radios aniónicos (Eisenman, 1963; Truesdell y Christ, 1967; Nachsen, 1985). Se graficó  $\Delta U_{c.-x}$  en función del radio del sitio aniónico, para la serie de cationes divalentes y para distintas distancias entre sitios (modelo ii). De esta forma, se pudo ajustar un radio aniónico y una distancia entre sitios (modelo ii), con base en la secuencia obtenida para este canal.

Es importante notar que las predicciones del modelo dependen

de los valores usados para los radios iónicos de los cationes divalentes y de sus respectivas energías de hidratación. Se usaron los radios iónicos de Pauling (1967). Marcus (1983) luego de analizar los valores para  $r_i$  obtenidos por diferentes métodos en los últimos diez años, concluye que los radios cristalinos de Pauling son los más adecuados para los radios de los cationes divalentes en solución acuosa. Las energías de hidratación usadas son de Marcus y Kertes (1969), puesto que en estas tablas se encontraron las  $\Delta U_{i-H_2O}$  para todos los cationes usados (ver tabla VI en Apéndice A).

#### L) Protocolos.

Puesto que se realizaron varios tipos de experimentos para cumplir con el objetivo propuesto, es conveniente resumir los protocolos tipos.

##### Experimentos en ausencia de calcio en la solución

Una vez incorporado el canal, se determinó la dependencia de potencial ( $P_o$  vs.  $V$ ) y la dependencia a la concentración de calcio en el lado CIS ( $P_o$  vs.  $[Ca^{2+}]$ ). Luego el lado CIS se perfundió con una solución 300 mM KF, MGPS 5 mM, pH 7. El  $CaF_2$  precipita ( $K_{ps} = 3,5 \times 10^{-11}$ , 20 °C), siendo la concentración de calcio libre en la solución alrededor de 3 nM. A concentraciones menores a 1  $\mu$ M de calcio en la

solución, no se observan fluctuaciones de corriente aún a +90 mV (i.e. la constante de disociación del canal para calcio es  $> 1 \times 10^{-6}$  M). Luego, se agregaron pequeños volúmenes de soluciones de cationes divalentes cuyas sales de  $F^-$  son solubles con el objeto de lograr concentraciones en el intervalo de 10 a 500  $\mu$ M en el lado CIS (el  $F^-$  precipita al  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Sr^{2+}$ ). Luego de probado el efecto de un cation divalente se lavó el lado CIS con KF 300 mM, se probó otro y así sucesivamente hasta probar la serie completa. Este punto es de importancia, puesto que después de varios experimentos preliminares se comprobó que la dependencia a la  $[Ca^{2+}]$  varía de un canal a otro, por lo cual los resultados obtenidos para un canal no son comparables cuantitativamente con los de otros canales. Por esta razón los resultados de activación se refieren a la activación de una serie de cationes divalentes probados en un mismo canal. Es importante notar que no fué trivial perfundir tantas veces el lado CIS. La membrana se rompía frecuentemente, durante la tercera o cuarta perfusión, por lo que el número de canales en los cuales se logró estudiar la serie completa de cationes divalentes, fué bajo.

Para estudiar la activación por  $Sr^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  se usó EGTA como agente quelante del  $Ca^{2+}$  (las constantes de

asociación de los iones  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  por EGTA son varios órdenes de magnitud menores que la de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA, (tablas de Martell y Smith, 1974)). Para calcular la concentración libre de los cationes divalentes en la solución, se utilizó un programa en computación que considera todas las especies que se ligan al EGTA y todas las constantes de asociación (Storer y Cornish-Bowden, 1976).

Experimentos en presencia de calcio en la solución.

El protocolo es similar al anterior, a excepción que se perfunde con KCl 200 mM, MOPS 5 mM, pH 7. La concentración de calcio en la solución es la proveniente de las impurezas,  $\sim 3\mu\text{M}$ .

Experimentos diseñados para determinar coeficientes de Hill. Una vez incorporado el canal se lavó el lado CIS con KCl 200 mM, MOPS 5 mM, pH 7. La concentración de calcio en el lado CIS se varió entre 10 y 500  $\mu\text{M}$  a intervalos de 5 a 50  $\mu\text{M}$ . Luego se lavó el lado CIS con la solución inicial y se agregaron de 100 a 500  $\mu\text{M}$  de catión divalente y se varió la concentración de calcio el intervalo indicado. Esta operación se repitió hasta completar una serie de cationes divalentes en el mismo canal.

## RESULTADOS

La sección de resultados se dividirá en tres partes:

- a) selectividad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  (o activación en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ );
- b) activación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- c) bloqueo por cationes divalentes.

## A) SELECTIVIDAD DEL SITIO QUE UNE CALCIO

El objetivo de este trabajo es caracterizar el sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  en el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ . El estudio de la selectividad de este sitio por cationes divalentes puede aportar información acerca de las características fisicoquímicas de este sitio (p.ej. accesibilidad, dimensiones de los grupos cargados). A continuación se mostrarán los resultados que permiten concluir sobre la selectividad en la activación (selectividad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ ), y sobre la forma de activación por los distintos cationes divalentes estudiados.

Para obtener resultados claros en cuanto a la selectividad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ , se encontró que es necesario:

a) Eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la solución. Se usaron dos métodos para eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la solución (proveniente de impurezas de las sales usadas): precipitación (con  $\text{F}^-$ ) y secuestro (con EGTA). Con  $\text{F}^-$  es posible estudiar la activación por  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ ; usando EGTA como agente quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  es posible estudiar la activación por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ .

b) Estudiar la selectividad de la activación en un mismo canal, puesto que existe gran variabilidad en la activación por cationes divalentes de canal en canal. Por ejemplo, se encontró que existen canales con distintas afinidades al  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Moczydlowski y col, 1985), pero prácticamente no cambia la dependencia de  $P_o$  con la  $[\text{Ca}^{2+}]$  (no cambia el número de Hill), ni la dependencia de  $P_o$  con el voltaje (no cambia la pendiente ( $n$ ) de las curvas de  $P_o$  con el voltaje).  
Selectividad en la activación.

En la figura 6 se muestran los registros de corriente del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de distintos cationes divalentes en la solución CIS. La concentración de calcio en la solución CIS es aproximadamente de 3 nM. Todos los resultados se refieren a un mismo voltaje (+70 mV, a

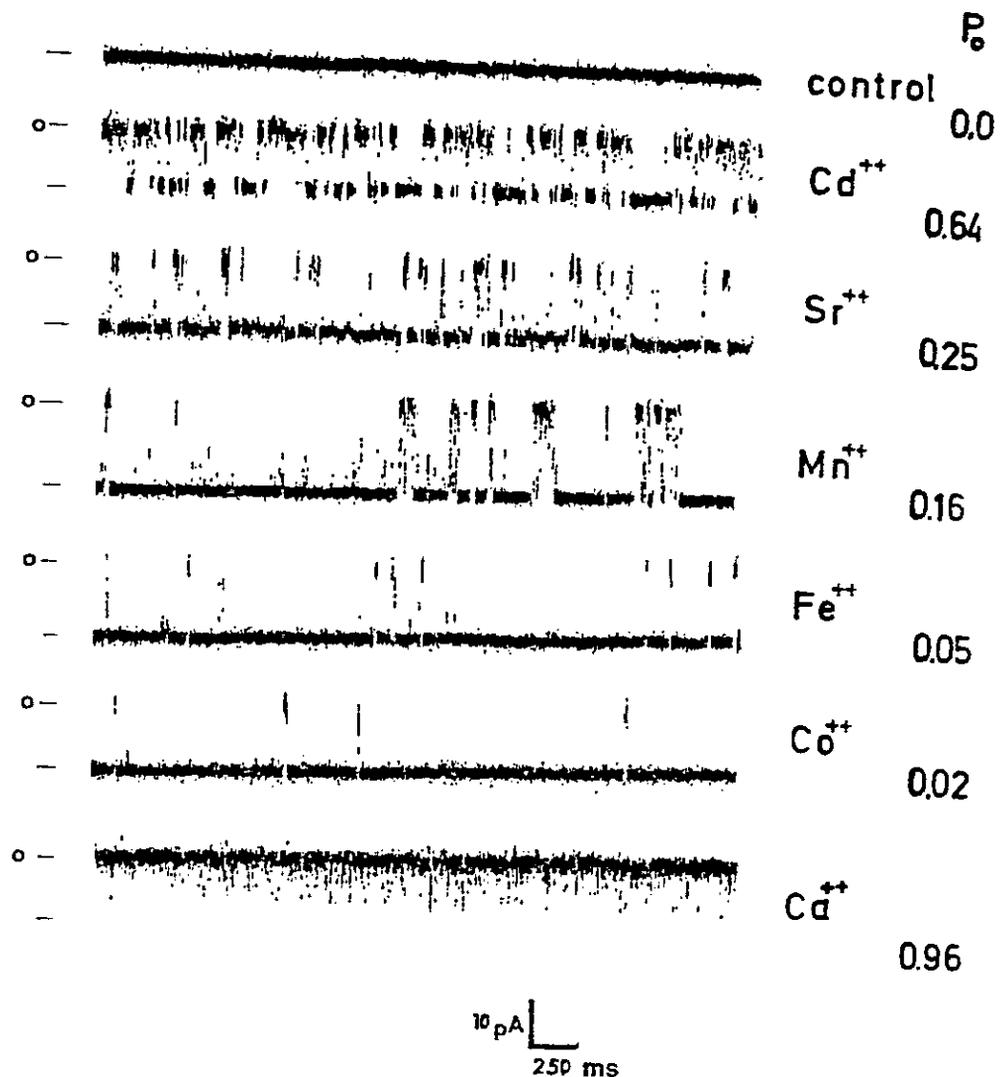


Figura 6  
Activación del canal por cationes divalentes.

Registros de corriente a través del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  incorporado en una membrana de PE, tomados a  $+70$  mV ( $Mn^{2+}$ ,  $V' = +80$  mV) y con  $200 \mu M$  de  $X^{2+}$ . Se indican las  $P_o$  (calculadas con a lo menos 1 min de registro). La concentración de  $Ca^{2+}$  es  $\sim 3$  nM (KF 300 mM). En el experimento con  $Sr^{2+}$  la concentración de  $Ca^{2+}$  es  $\sim 2$  nM (EGTA 200  $\mu M$ ). Estos registros se obtuvieron perfundiendo sucesivamente el lado CIS con los cationes divalentes indicados (ver Materiales y Métodos). También se muestra un registro con  $200 \mu M$   $Ca^{2+}$  y KCl 300 mM a  $+70$  mV.

excepción de  $Mn^{2+}$  (en este caso  $V = +80$  mV)), e igual concentración de catión divalente (200  $\mu M$ ). De los cationes divalentes probados (14 en total), solamente activan los que se indican en la figura 6. También se estudió el efecto de cationes trivalentes cuyo radio iónico es muy similar al del  $Ca^{2+}$  ( $Eu^{3+}$  y  $Tb^{3+}$ ). No se observó activación del canal por estos iones, aún a voltajes altos (+80 mV).

A partir de registros similares a los que se muestran en la figura 6, pero de mayor duración (a lo menos 1 minuto) igual voltaje e igual  $[X^{2+}]$  se puede establecer que la secuencia de activación del canal es:  $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$  (en 11 canales diferentes; sin embargo, se logró estudiar la serie completa sólo en 2 canales (dada la siguiente dificultad experimental: es difícil perfundir más de tres veces el lado CIS sin romper la membrana; ver tabla I).

Esta secuencia se conserva a distintos voltajes y concentraciones de cationes divalentes. Esto se muestra en las figuras 7 y 8 (cada P. se calculó a partir de a lo menos 300 transiciones).

Con base en las constantes de disociación para los diferentes cationes divalentes, obtenidas por un ajuste de los puntos de la figura 8 a la ecuación 6, se puede establecer que la efectividad en la activación, relativa al

Tabla I  
 Activación del canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>,  
 por cationes divalentes en ausencia de Ca<sup>2+</sup>.

Secuencia de activación	P. <sub>o</sub> (80 mV), [X <sup>2+</sup> ] = 200 μM	N
Ca > Cd > Sr > Mn > Fe > Co	1,0:0,7:0,31:0,1:0,04:0,01	2
Ca > Cd > Sr	1,0:0,68:0,28	1
Ca > Cd > Mn	1,0:0,70:0,10	3
Ca > Fe > Co	1,0:0,05:0,015	2
Ca > Sr > Co	1,0:0,25:0,016	1
Ca > Mn > Co	1,0:0,14:0,012	2

Esta tabla muestra las secuencias de activación estudiadas en once canales. Se muestran también las P.<sub>o</sub> calculadas a partir de registros (de al menos 1 min de duración) tomados a +80 mV, y en presencia de 200 μM de catión divalente en el lado CIS. N indica el número de membranas en las cuales se estudió la serie de cationes divalentes.

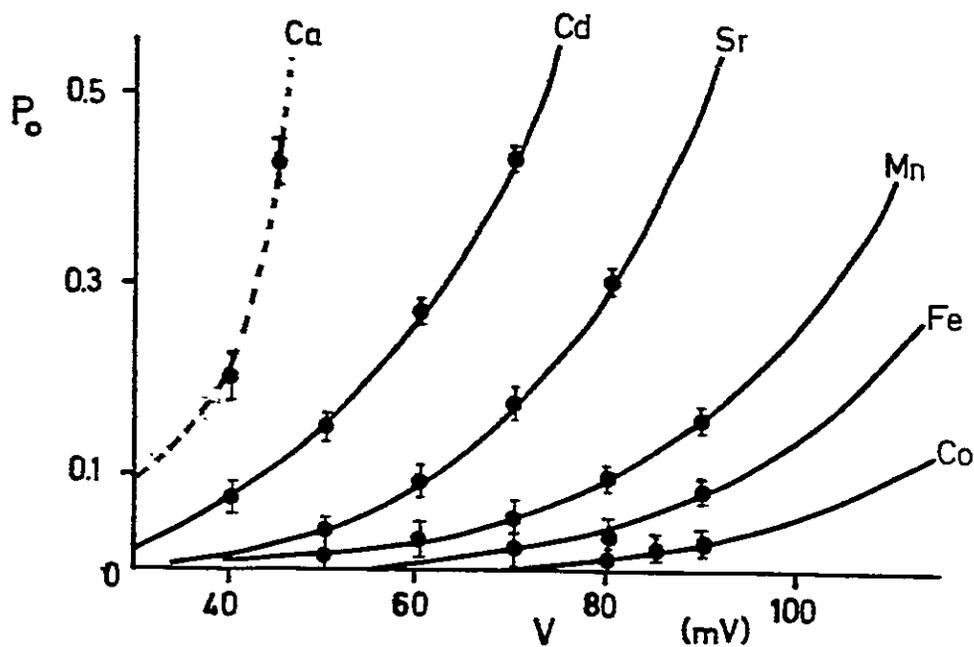


Figura 7  
 $P_o$  en función del voltaje.

Gráfico de  $P_o$  en función del potencial eléctrico a través de la membrana con 200  $\mu\text{M}$  de  $X^{2+}$  y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución CIS (KF 300 mM, MOPS-K pH 7). Los puntos corresponden a los resultados para 2 canales y las líneas continuas a una distribución de Boltzmann para  $P_o$  (ajuste no lineal a la ecuación 1). Se muestra también la curva cuando hay  $\sim 3 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  en el lado CIS (KCl 300 mM, MOPS-K pH 7; 8 canales). Los parámetros ajustados fueron:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 50$  mV;  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $n = 1,9$ ,  $V_o = 74$  mV;  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 91$  mV;  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $n = 1,8$ ,  $V_o = 120$  mV;  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $n = 1,8$ ,  $V_o = 126$  mV;  $\text{Co}^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 140$  mV.

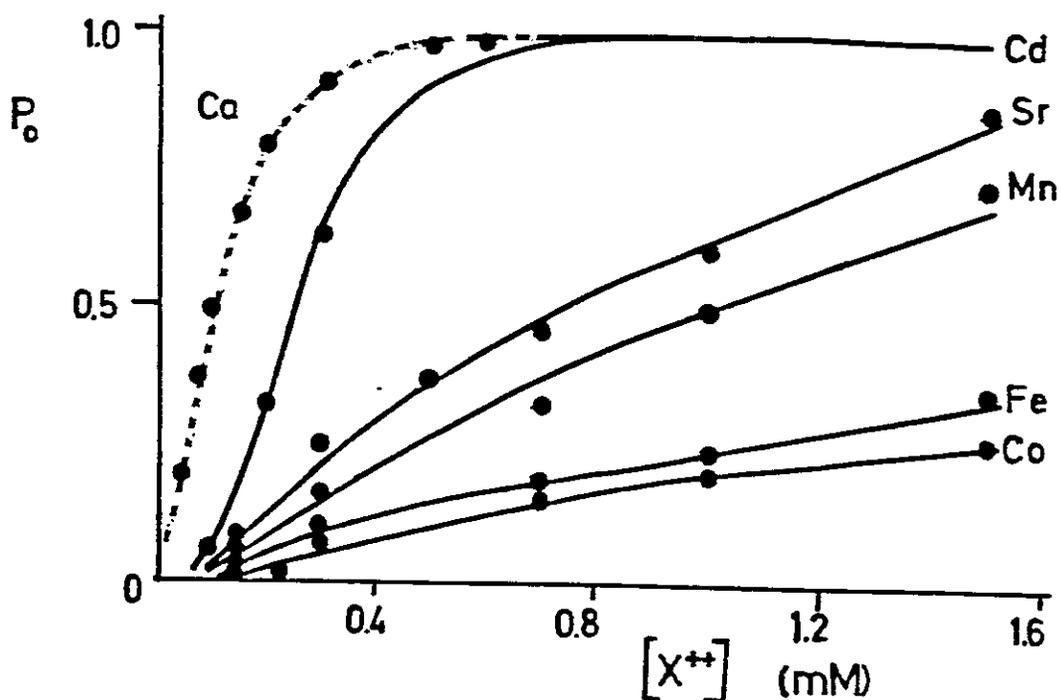


Figura 8  
 $P_o$  en función de la concentración de  $X^{2+}$ .

$P_o$  en función de la  $[X^{2+}]$  en el lado CIS. KF 300 mM, MOPS-K pH 7. Potencial eléctrico a través de la membrana: +80 mV (en el caso del  $Ca^{2+}$ ,  $V = +30$  mV). Los resultados se refieren a una membrana con un canal. Las líneas corresponden a lo que predice la ecuación 6. Los parámetros ajustados fueron:  $Ca^{2+}$ ,  $N_H = 2,00$ ,  $K_D$  (mM <sup>$N_H$</sup> ) = 0,009 (en el caso en que  $V = +80$  mV,  $N_H = 2,13$ ,  $K_D \sim 10^{-5}$ );  $Cd^{2+}$ ,  $N_H = 2,60$ ,  $K_D = 0,02$ ;  $Sr^{2+}$ ,  $N_H = 1,45$ ,  $K_D = 0,63$ ;  $Mn^{2+}$ ,  $N_H = 1,67$ ,  $K_D = 0,94$ ;  $Fe^{2+}$ ,  $N_H = 1,07$ ,  $K_D = 3,00$ ;  $Co^{2+}$ ,  $N_H = 1,12$ ,  $K_D = 4,35$ .

$\text{Ca}^{2+}$ , es: 1 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) :  $1 \times 10^{-3}$  ( $\text{Cd}^{2+}$ ) :  $1,6 \times 10^{-5}$  ( $\text{Sr}^{2+}$ ) :  $1 \times 10^{-5}$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ) :  $3 \times 10^{-6}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ) :  $2 \times 10^{-6}$  ( $\text{Co}^{2+}$ ).

Similitudes con la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las figuras 7 y 8 también revelan que los diferentes cationes divalentes activan el canal de manera similar a como lo hace el  $\text{Ca}^{2+}$ , puesto que las curvas de  $P_o$  en función de voltaje y de  $P_o$  en función de la  $[\text{X}^{2+}]$  tienen la misma forma que las mismas curvas para calcio (ver figura 7 y figura 8), i.e, los puntos experimentales para la activación por los diferentes cationes divalentes, ajustan a las ecuaciones derivadas para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Con el objetivo de averiguar cuántos iones participan en el proceso de activación, se construyeron gráficos de Hill para  $P_o$  en función de la concentración de catión divalente en el lado CIS. La figura 9 muestra el resultado de graficar la constante de equilibrio para la abertura y cierre del canal ( $K$ ) en función de la concentración de catión divalentes. La pendiente de estas gráficas mide la molecularidad aparente con que los cationes divalentes afectan a la constante de equilibrio  $K$  (que es igual a  $P_o/(1-P_o)$ ) y, en este caso, es el límite inferior del número de sitios que participan en el sistema (Levitzki, 1978). Se necesitan entre 2 y 3 iones  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$  y entre 1 y 2 iones  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  para

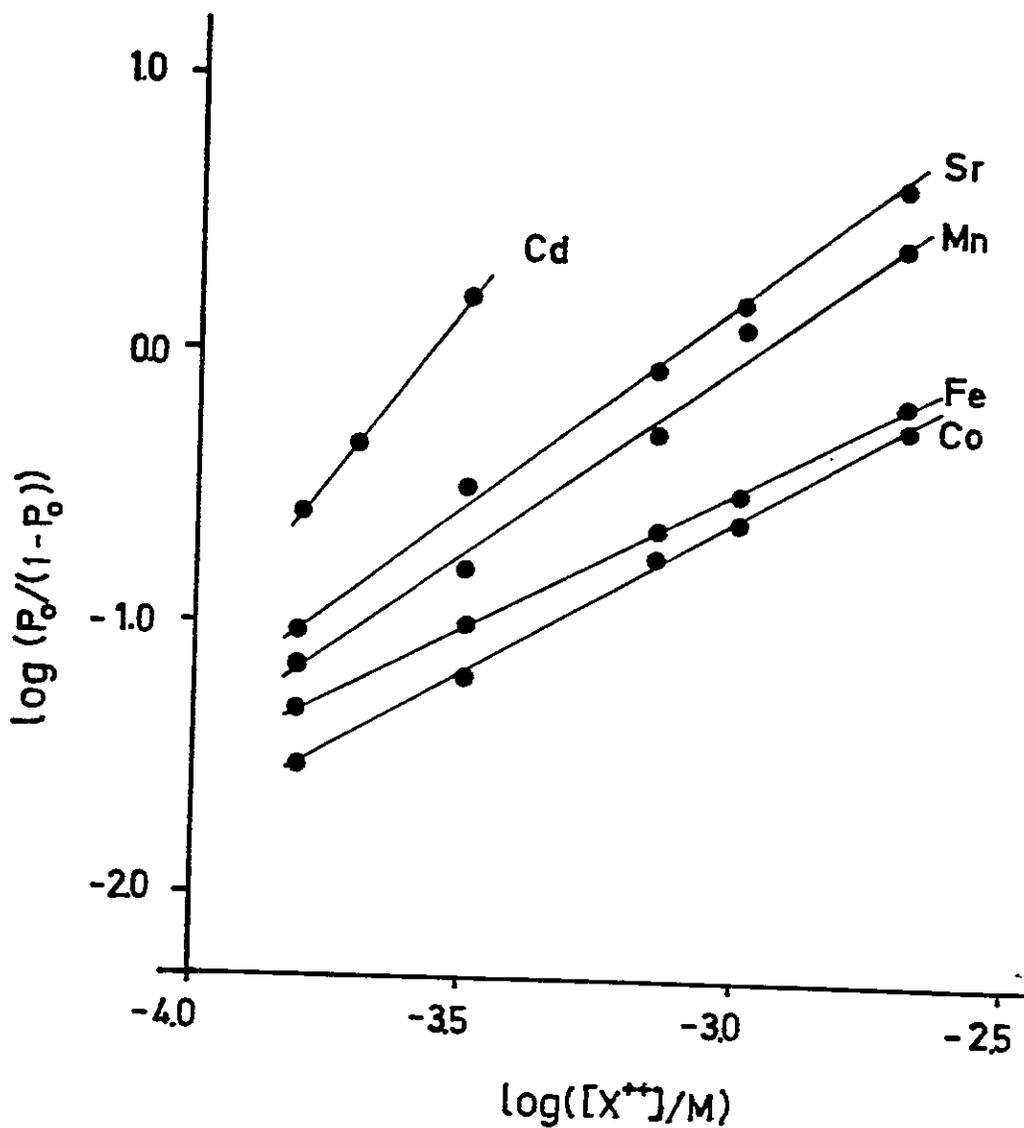


Figura 9

Gráficos de Hill para la activación por cationes divalentes.

Estos gráficos corresponden a una linealización de las curvas de la figura 8. Las pendientes para cada caso son:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $N_w = 2,59$  ( $r=0,99$ );  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $N_w = 1,54$  ( $r=0,99$ );  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $N_w = 1,55$  ( $r=0,98$ );  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $N_w = 1,00$  ( $r=0,99$ );  $\text{Co}^{2+}$ ,  $N_w = 1,14$  ( $r=0,99$ ).

abrir el canal. Se encontró que el valor para el número de Hill para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ , varía entre 1,3 y 2,4.

Además, si se analiza con más detalle la cinética de activación (p.ej. la activación por  $\text{Mn}^{2+}$ ), se encuentra que ésta puede ser descrita con el modelo propuesto por Moczydlowski y Latorre (1983; figura 1C) para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ , esto es, el tiempo medio que el canal permanece en el estado abierto es proporcional a  $[\text{X}^{2+}]$ , el tiempo medio que el canal permanece en el estado cerrado es proporcional a  $[\text{X}^{2+}]^{-1}$ , y las constantes cinéticas  $\alpha$  y  $\beta$  no dependen del potencial eléctrico a través de la membrana.

#### Conclusión.

Se encontraron cationes divalentes distintos al  $\text{Ca}^{2+}$  que son capaces de activar el canal. Todos son menos eficaces que el  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos cationes divalentes activan el canal en forma similar a como lo hace el  $\text{Ca}^{2+}$ . La secuencia de afinidad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  en esta proteína es:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ , y la efectividad en la activación, respectivamente es: 1 :  $1 \times 10^{-2}$  :  $1,6 \times 10^{-3}$  :  $1 \times 10^{-5}$  :  $3 \times 10^{-6}$  :  $2 \times 10^{-6}$ .

## B) ACTIVACION EN PRESENCIA DE CALCIO

Los resultados en ausencia de calcio en la solución indican que, algunos cationes divalentes son capaces de activar el canal porque se unen al mismo sitio en el cual se une el  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, si este es el único mecanismo por el cual los diferentes cationes divalentes son capaces de activar el canal, se espera que la secuencia de activación encontrada no cambie, cuando existe  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución.

En la figura 10 se muestran algunos registros de corriente del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , con distintas concentraciones de cationes divalentes en la solución CIS, en presencia de  $\text{Ca}^{2+} \sim 3\mu\text{M}$ , a un mismo voltaje. Se escogieron concentraciones de los diferentes  $\text{X}^{2+}$  tales que dieran un  $P_o$  similar. Se observa que, en presencia de los diferentes cationes divalentes, la  $P_o$  es mayor que cuando existe solamente calcio en la solución. Además de los cationes mostrados en la figura 10, también se encontró activación por los iones  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . De acuerdo a la magnitud de las concentraciones de  $\text{X}^{2+}$  se puede establecer que, la secuencia de activación en presencia de  $\text{Ca}^{2+} 3 \mu\text{M}$  es:

$$\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}.$$

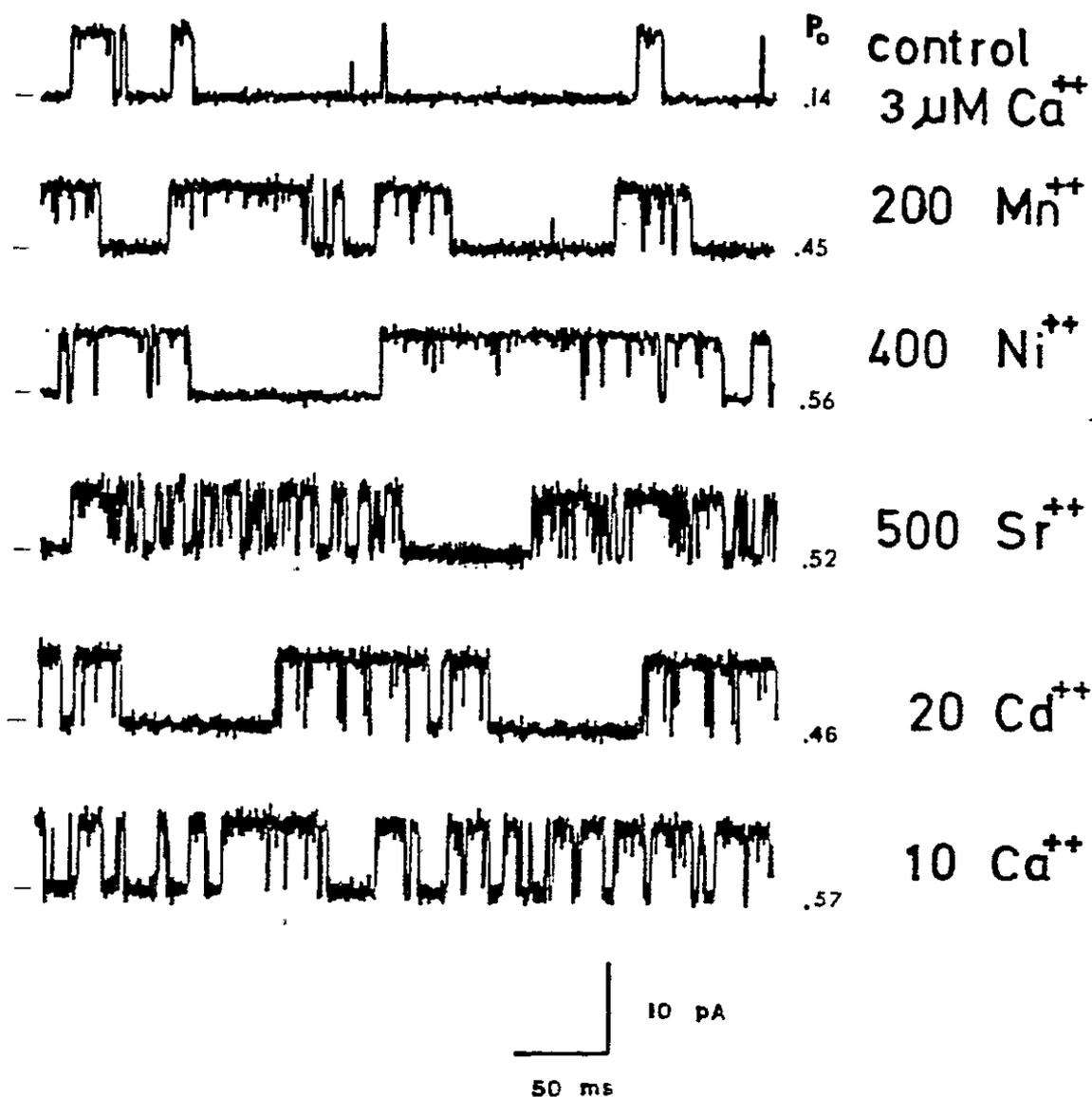


Figura 10

Activación por cationes divalentes en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ .

Registros de corriente a través del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{++}$ , obtenidos a  $+40 \text{ mV}$  y  $[\text{Ca}^{++}] = 3 \mu\text{M}$  CIS,  $\text{KCl}$   $300 \text{ mM}$  (solución control). Este experimento fue realizado en un solo canal, lavando sucesivamente el lado CIS con la solución control y agregando las concentraciones indicadas de  $\text{X}^{++}$ . Se señala  $P_0$  para cada caso. Las marcas en el extremo izquierdo de los registros, indican el estado cerrado del canal.

Esta secuencia se repite, por lo menos en seis canales estudiados en este experimento (solamente en dos canales se logró estudiar la serie completa, debido a la dificultad ya mencionada más arriba).

Estos resultados revelan dos diferencias importantes respecto a la activación en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ : el  $\text{Sr}^{2+}$  es menos efectivo que el  $\text{Mn}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ahora activan en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En la figura 11 se muestra un gráfico de  $P_0$  en función de voltaje, para una serie completa de cationes divalentes estudiados en un mismo canal. Esta figura muestra que la secuencia de activación encontrada, se conserva con el voltaje a través de la membrana.

En cambio, como lo revela la figura 12, la secuencia de activación depende de la concentración de calcio en la solución (algunas curvas se cruzan). Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es menor a  $10 \mu\text{M}$ , la secuencia de activación es igual a la ya mostrada, pero cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es mayor a  $10 \mu\text{M}$  la secuencia de activación ahora es:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ . En este último caso el  $\text{Fe}^{2+}$  activa menos que el  $\text{Co}^{2+}$ . Esta aparente diferencia es probable que se deba a la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$ , la cual es bastante rápida en las condiciones experimentales ( $\sim 5$  min) y la duración del experimento completo con  $\text{Fe}^{2+}$  es  $\sim 10$  min.

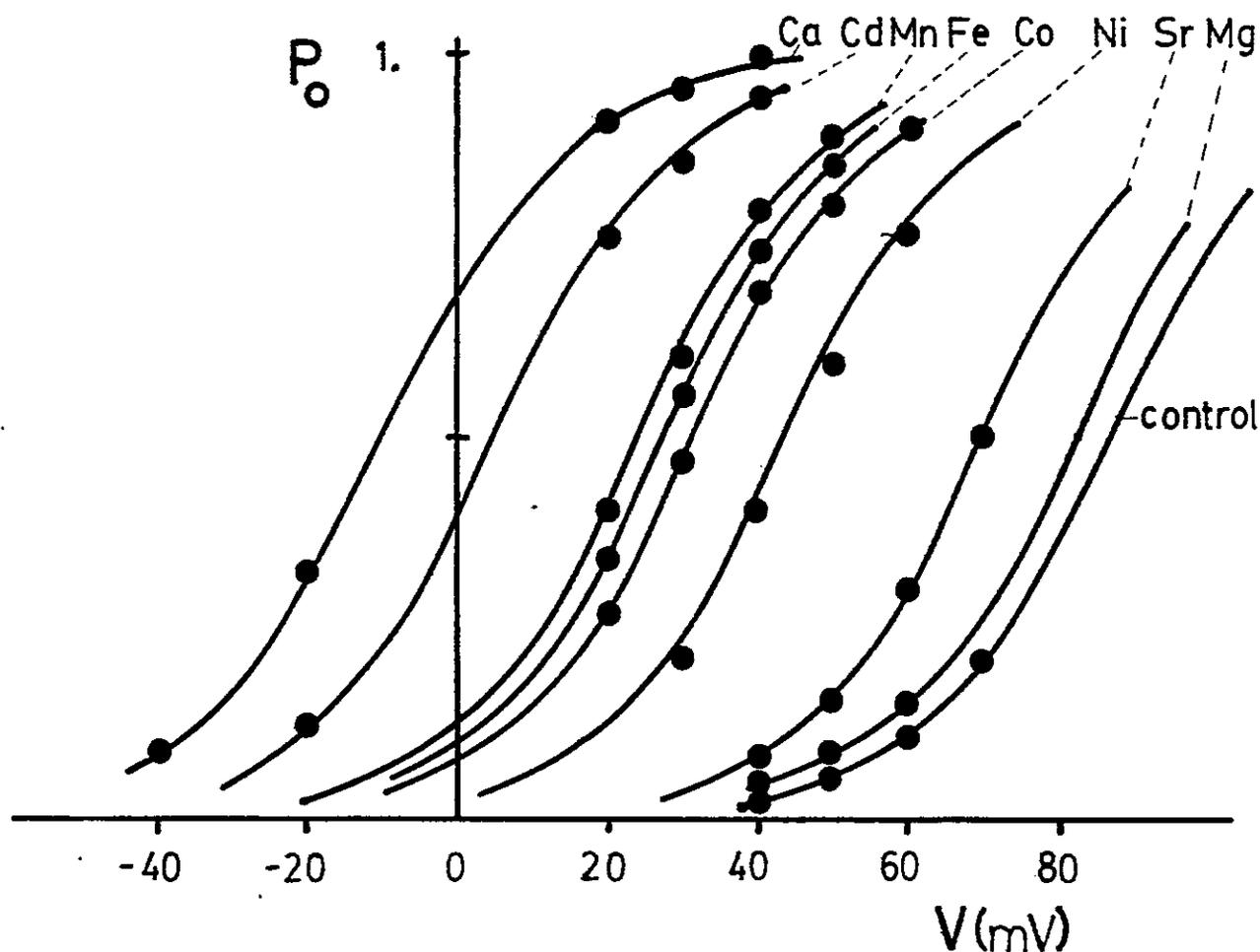


Figura 11

$P_o$  en función del voltaje, para la activación por  $X^{2+}$  en presencia de  $Ca^{2+}$ .

$P_o$  en función del potencial eléctrico a través de la membrana.  $[X^{2+}] = 300 \mu\text{M}$ , KCl 150 mM, MOPS-K pH 7. Los puntos corresponden a los resultados para un canal y las líneas continuas corresponden a un ajuste no lineal a la ecuación 1. Los parámetros ajustados fueron:  $Ca^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = -22$  mV;  $Cd^{2+}$ ,  $n = 1,9$ ,  $V_o = 10$  mV;  $Mn^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 24$  mV;  $Fe^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 28$  mV;  $Co^{2+}$ ,  $n = 1,9$ ,  $V_o = 32$  mV;  $Ni^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 44$  mV;  $Sr^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 71$  mV;  $Mg^{2+}$ ,  $n = 2,0$ ,  $V_o = 85$  mV; Control ( $[Ca^{2+}] = 3 \mu\text{M}$ ),  $n = 2,0$ ,  $V_o = 88$  mV.

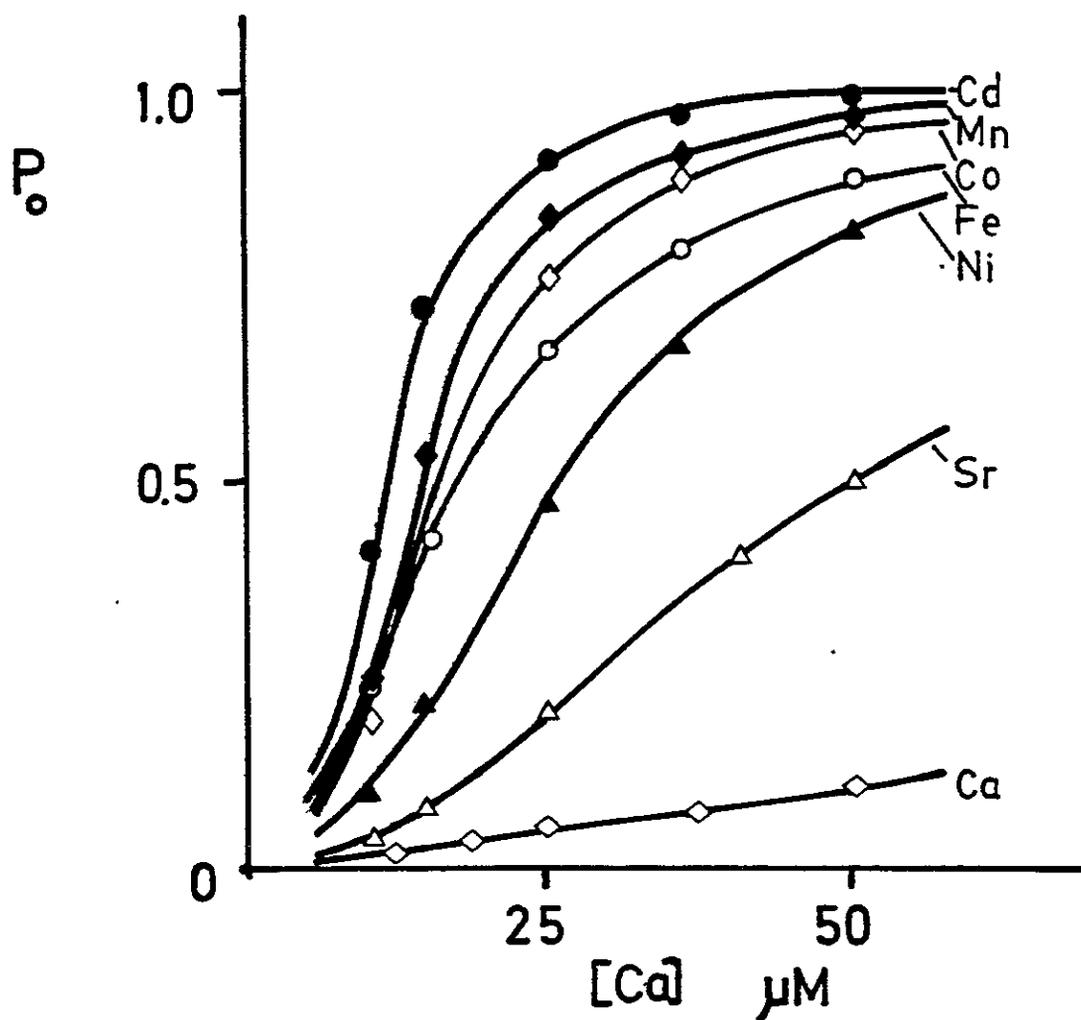


Figura 12

P. en función de la  $[Ca^{2+}]$  en presencia de  $X^{2+}$ .

P. en función de la  $[Ca^{2+}]$  CIS.  $V = +30$  mV,  $[X^{2+}] = 150$  µM, KCl 150 mM, MOPS-K pH 7. Los puntos corresponden a datos de un canal y las líneas continuas a un ajuste a la ecuación 6. Los parámetros ajustados fueron:  $Cd^{2+}$ ,  $N_H = 3,15$ ,  $K_D = 6,7 \times 10^{-7}$  (mM<sup>N<sub>H</sub></sup>);  $Mn^{2+}$ ,  $N_H = 3,00$ ,  $K_D = 3,0 \times 10^{-6}$ ;  $Fe^{2+}$ ,  $N_H = 2,00$ ,  $K_D = 3,3 \times 10^{-4}$ ;  $Co^{2+}$ ,  $N_H = 2,80$ ,  $K_D = 1,1 \times 10^{-5}$ ;  $Ni^{2+}$ ,  $N_H = 2,40$ ,  $K_D = 1,60 \times 10^{-4}$ ;  $Sr^{2+}$ ,  $N_H = 2,00$ ,  $K_D = 2,5 \times 10^{-3}$ ;  $Ca^{2+}$ ,  $N_H = 2,20$ ,  $K_D = 2,2 \times 10^{-2}$ .

A esta concentración el  $Mg^{2+}$  no aumenta el  $N_H$ , ni cambia  $K_D$  (la curva para  $Mg^{2+}$  150 µM es idéntica a la curva para  $Ca^{2+}$ ).

Con base en estos resultados podemos concluir que:

- Los cationes divalentes que activan en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  también activan en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ; la secuencia de activación es:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ .
- La secuencia de activación es distinta a la encontrada en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Algunos cationes divalentes, como el  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , que no activan en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  activan en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Algunos cationes divalentes ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) no activan ni en ausencia, ni en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución.

Los resultados más sorprendentes de la activación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se refieren a la activación por los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . A continuación se mostrarán otros resultados obtenidos para la activación por  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , con el objetivo de averiguar el mecanismo por el cual estos iones activan el canal.

**Activación por  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ .**

Los resultados obtenidos para el  $Mg^{2+}$ , se muestran en la figura 13. El  $Mg^{2+}$  aumenta  $P_o$  en concentraciones milimolares en el lado CIS (figura 13A). Este aumento depende de la  $[Mg^{2+}]$  y  $[Ca^{2+}]$  en el lado CIS (figura 13B). No solamente aumenta la afinidad aparente para el  $Ca^{2+}$ , también aumenta la cooperatividad en la activación por  $Ca^{2+}$ : la curva de activación es 'más' sigmoidea en presencia de  $Mg^{2+}$ . Al construir gráficos de Hill para  $P_o$  en función de  $[Ca^{2+}]$  se observa un claro aumento en  $N_H$  cuando el  $Mg^{2+}$  está presente en el lado CIS (figura 13C). El  $N_H$  en ausencia de  $Mg^{2+}$  o con  $Mg^{2+}$  en el lado TRANS, tiene un valor promedio de 2,0 (1,4 a 2,3 ; 8 medidas) y en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM en el lado CIS  $N_H$  tiene un valor promedio de 4,7 (3,4 a 5,8; 6 medidas). Puesto que existe una gran variabilidad en la 'personalidad' individual de cada canal, se compararon las curvas de activación con y sin  $Mg^{2+}$  en cada canal. Se encontró que el  $N_H$  aumenta al aumentar la concentración de  $Mg^{2+}$  en el lado CIS:  $N_H = 3,0$  con 1,0 mM;  $N_H = 4,0$  con 5 mM;  $N_H = 5,8$  con 10 mM.

Por lo tanto, el  $Mg^{2+}$  no compite ni sustituye al  $Ca^{2+}$  en la activación del canal sino que, se comporta como un efector alostérico, puesto que aumenta la cooperatividad en la

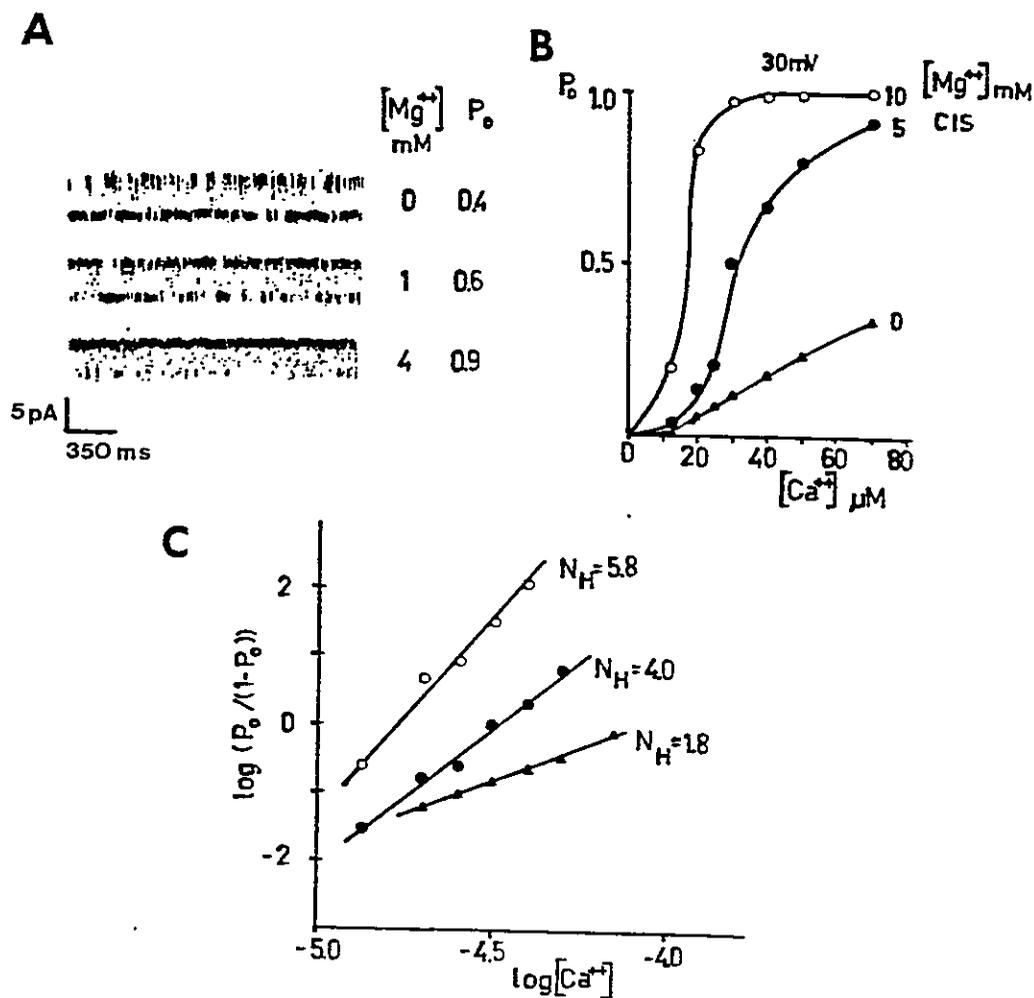


Figura 13  
Activación por  $Mg^{2+}$ .

- A. Efecto de la  $[Mg^{2+}]$  en el lado CIS. Se muestran registros de corriente del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  en KCl 200 mM, 5 mM MOPS-K pH 7,0,  $Ca^{2+}$  10  $\mu$ M,  $V = +30$  mV. Se indica la concentración de  $Mg^{2+}$  en el lado CIS y la  $P_0$  respectiva.
- B. Gráfico de  $P_0$  en función de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el lado CIS. Las líneas continuas son ajustes a la ecuación 6.
- C. Gráfico de Hill para la activación por  $Ca^{2+}$  en presencia de  $Mg^{2+}$ . El  $Mg^{2+}$  en lado CIS claramente aumenta el  $N_H$ .  
Símbolos:  $\blacktriangle = 0$  mM  $Mg^{2+}$ ,  $\bullet = 5$  mM  $Mg^{2+}$ ,  $\circ = 10$  mM  $Mg^{2+}$ .

activación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, el  $\text{Mg}^{2+}$  aumenta la afinidad aparente del canal por  $\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  en este canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  de TT de rata, también lo estudió en detalle Golowash (Golowash y col, (1985), y datos no publicados), obteniendo resultados muy semejantes.

Según estos resultados es posible postular un mecanismo, en el cual el  $\text{Mg}^{2+}$  interactúa con un sitio específico en la proteína que es topográficamente distinto a los sitios que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión del  $\text{Mg}^{2+}$  produciría un cambio conformacional específico en el sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ . Puesto que el número de Hill representa el límite inferior del número de sitios que participan en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo más simple es pensar que el  $\text{Mg}^{2+}$  'desenmascara' nuevos sitios para  $\text{Ca}^{2+}$  en la proteína, homólogos a los que existen en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Esta conclusión también es válida para el  $\text{Ni}^{2+}$ . Este ión activa sólo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución CIS. En presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  150  $\mu\text{M}$  en el lado CIS el  $N_H$  es 2,4 (+30 mV, dos membranas) y en presencia de 500  $\mu\text{M}$  el  $N_H$  es 3,1 (+30 mV, dos membranas). En presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  500  $\mu\text{M}$  en el lado TRANS, el  $N_H$  es idéntico al control (solamente  $\text{Ca}^{2+}$  en

la solución CIS).

La capacidad de aumentar el número de Hill no es una propiedad exclusiva de los cationes  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . Al construir gráficos de Hill para la activación por  $Ca^{2+}$  en presencia de los diferentes cationes divalentes estudiados, se encuentra que el  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , también son capaces de aumentar significativamente el  $N_H$ . Estos resultados se muestran en la tabla II. Se observa que a una concentración de  $X^{2+}$  de 150  $\mu M$  o de 500  $\mu M$ , tanto el  $Mg^{2+}$  como el  $Sr^{2+}$  no aumentan  $N_H$  (se excluye el  $Fe^{2+}$ , puesto que se oxida); en cambio, los iones  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  aumentan significativamente  $N_H$  respecto al control. En el caso del  $Mg^{2+}$ , se empieza observar un aumento significativo de  $N_H$  a partir de una concentración de 2 mM.

Tabla II  
 Números de Hill para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 en presencia de cationes divalentes.

$\text{X}^{2+}$	150 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	5 mM
(control) $\text{Ca}^{2+}$		1,4 a 2,3	
$\text{Cd}^{2+}$	3,1	-	-
$\text{Sr}^{2+}$	2,0	2,0	-
$\text{Mn}^{2+}$	3,0	4,1	-
$\text{Co}^{2+}$	2,9	3,6	-
$\text{Ni}^{2+}$	2,4	3,1	-
$\text{Mg}^{2+}$	2,0	2,0	4,0

Esta tabla muestra que los cationes divalentes capaces de inducir un aumento en el número de Hill para la activación de  $\text{Ca}^{2+}$ , son:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .  $V = +30$  mV. También muestra que el aumento en  $N_H$  es dependiente de la concentración de  $\text{X}^{2+}$ . Todos los  $N_H$  se obtuvieron a partir de medidas en diferentes canales. El símbolo "-" significa, que no se realizó el experimento.

**Conclusión.**

Según los resultados presentados para la activación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , en el proceso de activación por  $\text{X}^{2+}$  del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , existen dos mecanismos: unión del  $\text{X}^{2+}$  a un sitio específico para  $\text{Ca}^{2+}$  (sitio 'C'; este sitio está involucrado en la abertura del canal) y unión a un sitio alosterico (sitio 'M'; que desenmascararía nuevos sitios específicos para  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Los iones  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se unirían sólo al sitio 'C'; los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  se unirían sólo al sitio 'M', y los iones  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  interactuarían con ambos sitios.

## C) BLOQUEO POR CATIONES DIVALENTES

Además de encontrar que los cationes divalentes son capaces de activar el canal en ausencia o en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución, se encontró que los cationes divalentes son capaces de bloquear la vía de conducción del canal o de disminuir la fracción del tiempo que el canal permanece en el estado abierto. Los experimentos de bloqueo se realizaron con el objetivo de averiguar si, en la proteína, el sitio de bloqueo está separado del sitio de activación. Estos resultados se muestran a continuación. Además se muestra el efecto de algunos cationes trivalentes, sobre la conductancia del canal.

Bloqueo de la corriente a través del canal.

Se encontró que los cationes divalentes estudiados pueden bloquear la corriente que pasa a través del canal de dos formas: bloqueo de cinética rápida y bloqueo de cinética lenta.

a) bloqueo de cinética rápida. Este tipo de bloqueo lo inducen la mayoría de los cationes divalentes y los dos cationes trivalentes estudiados.

En este tipo de bloqueo el tiempo de permanencia en el

estado bloqueado es pequeño, y se produce una disminución aparente de la conductancia. Esta disminución es dependiente del voltaje a través de la membrana (ver figura 14 y 15), y está descrita por la siguiente expresión derivada por Woodhull (Woodhull, 1973):

$$I = I_0 / \{1 + [B] / K_d(0) \exp(z\delta FV/RT)\} \quad (7)$$

en que  $I$  es la corriente en presencia del bloqueador,  $I_0$  en ausencia de éste,  $[B]$  la concentración de bloqueador,  $K_d(0)$  la constante de disociación del bloqueador del sitio de ligamen a potencial cero, y  $z\delta$  la fracción del potencial,  $V$ , que afecta la energía del ion bloqueador en el sitio de ligamen. Si el potencial cae linealmente a lo largo del poro, una fracción del potencial equivale a una fracción de distancia, por lo que el parámetro  $z\delta$  se le llama comúnmente distancia eléctrica o valencia efectiva de bloqueo. Usando una linealización de la ecuación 7 se obtuvieron los parámetros  $K_d(0)$  y  $z\delta$ , los que se muestran en la tabla III. Se aprecia que los cationes trivalentes son los más potentes como bloqueadores de la conductancia. La secuencia de bloqueo, según el valor de  $K_d(0)$ , es:

$Tb^{3+}$ ,  $Eu^{3+} > Pb^{2+} > Cu^{2+} > Hg^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+}$ . No se observó disminución en la conductancia, en presencia de los cationes,  $Co^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ .



Figura 14  
 Bloqueo de la corriente a través del canal  
 inducido por cationes trivalentes.

Registros de corriente a través del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  incorporado en una membrana de PE, en presencia de  $\text{KCl}$  150 mM, MOPS-K 5 mM, pH 7 y  $[\text{Ca}^{2+}] = 15 \mu\text{M}$  (solución control). En presencia de  $\text{Eu}^{3+}$  o  $\text{Tb}^{3+}$  120  $\mu\text{M}$  en el lado CIS se observa que disminuye la conductancia del canal. El estado cerrado se señala mediante marcas a la izquierda de los registros. El efecto de  $\text{Tb}^{3+}$  es idéntico al de  $\text{Eu}^{3+}$ .

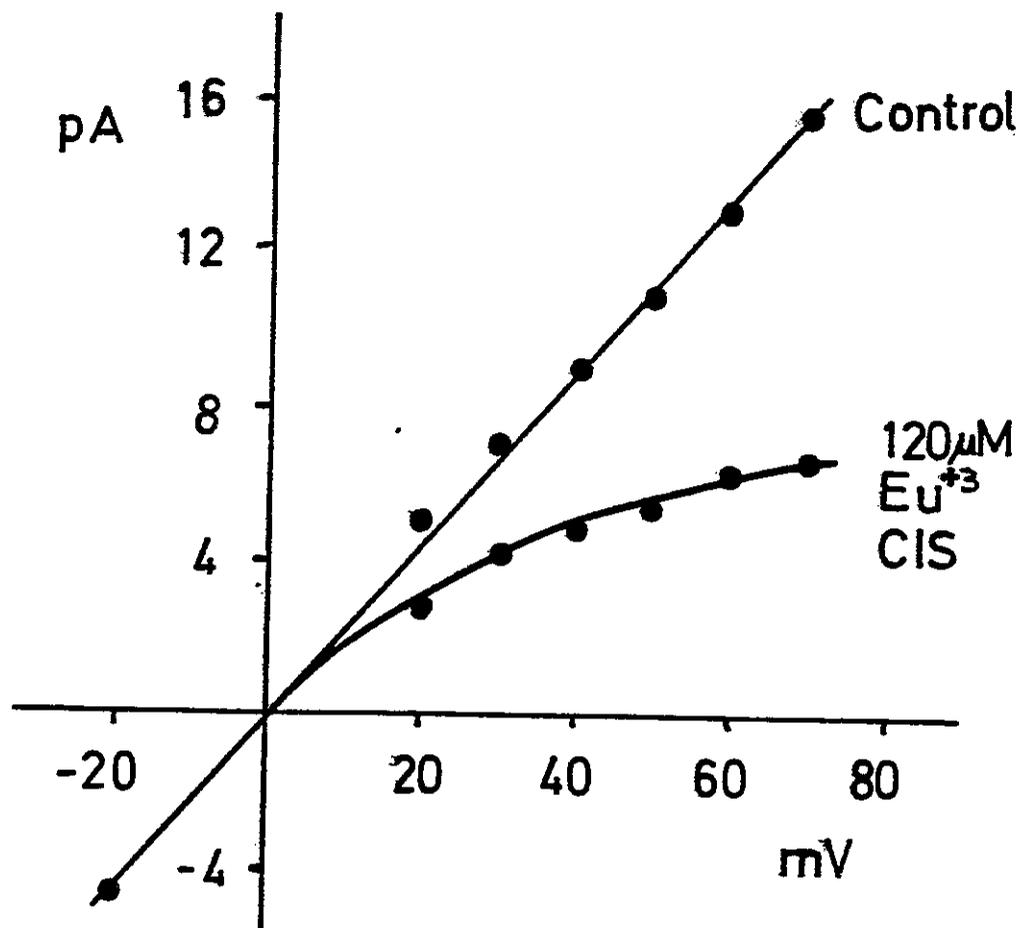


Figura 15  
Bloqueo dependiente de voltaje  
inducido por cationes trivalentes.

Curvas corriente en función del voltaje para el control (ver figura 14) y cuando se agrega  $\text{Eu}^{3+}$  120  $\mu\text{M}$  en el lado CIS. Se puede observar que el bloqueo es dependiente del voltaje. Las líneas continuas corresponden a un ajuste visual de los puntos. No se observa bloqueo a potenciales negativos.

Tabla III  
Bloqueo de cinética rápida para cationes divalentes.

Catión divalente $X^{2+}$	Concentración $[X^{2+}]$ (mM)	$K_d(0)$ (mM)	$z\delta$
$Tb^{3+}$ , $Eu^{3+}$	0,06 - 0,20	0,045	0,48
$Pb^{2+}$	0,06 - 0,18	0,40	0,34
$Cu^{2+}$	0,10	0,60	0,30
$Hg^{2+}$	0,06	0,74	0,31
$Ca^{2+}$	0,10 - 5,00	1,80	0,40
$Mn^{2+}$	0,20 - 3,00	4,00	0,35
$Zn^{2+}$	0,70	5,10	0,30
$Fe^{2+}$	0,20 - 3,00	8,40	0,42
$Mg^{2+}$	2,00 - 50,0	25,00	0,35
$Sr^{2+}$	0,20 - 7,00	90,00	0,40

Esta tabla muestra el bloqueo rápido inducido por cationes divalentes, cuando están presentes en el lado CIS en el rango de concentraciones que se indican. Los parámetros  $K_d(0)$  y  $z\delta$  se obtuvieron a partir de una linealización de la ecuación 7.

Se observa que para los cationes divalentes, el valor para la valencia efectiva de bloqueo es muy similar, siendo el valor promedio igual a  $0,35 \pm 0,05$ . En el caso de los cationes trivalentes ésta es mayor e igual a  $0,48$ . Sin embargo, la distancia eléctrica,  $\delta$ , para los diferentes cationes divalentes y trivalentes es muy similar. Esta tiene un valor promedio igual a  $0,17 \pm 0,02$ .

b) bloqueo de cinética lenta. En este caso es posible visualizar largos periodos en que el canal permanece cerrado.

Presentan este tipo de bloqueo los iones:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  (ver figura 16 B),  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . El  $\text{Ba}^{2+}$  es aparentemente el más efectivo en inducir este tipo de bloqueo ( $K_b$  (aparente) =  $3 \times 10^{-6}$  M, Vergara y Latorre (1983)).

Disminución de  $P_o$ .

Se encontró que algunos cationes divalentes son capaces de disminuir la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto,  $P_o$ . Se observó que los cationes,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , cuando se agregan al lado citoplasmático del canal, disminuyen el número de canales presentes en la membrana sin inducir un bloqueo lento (figura 16 A). En el

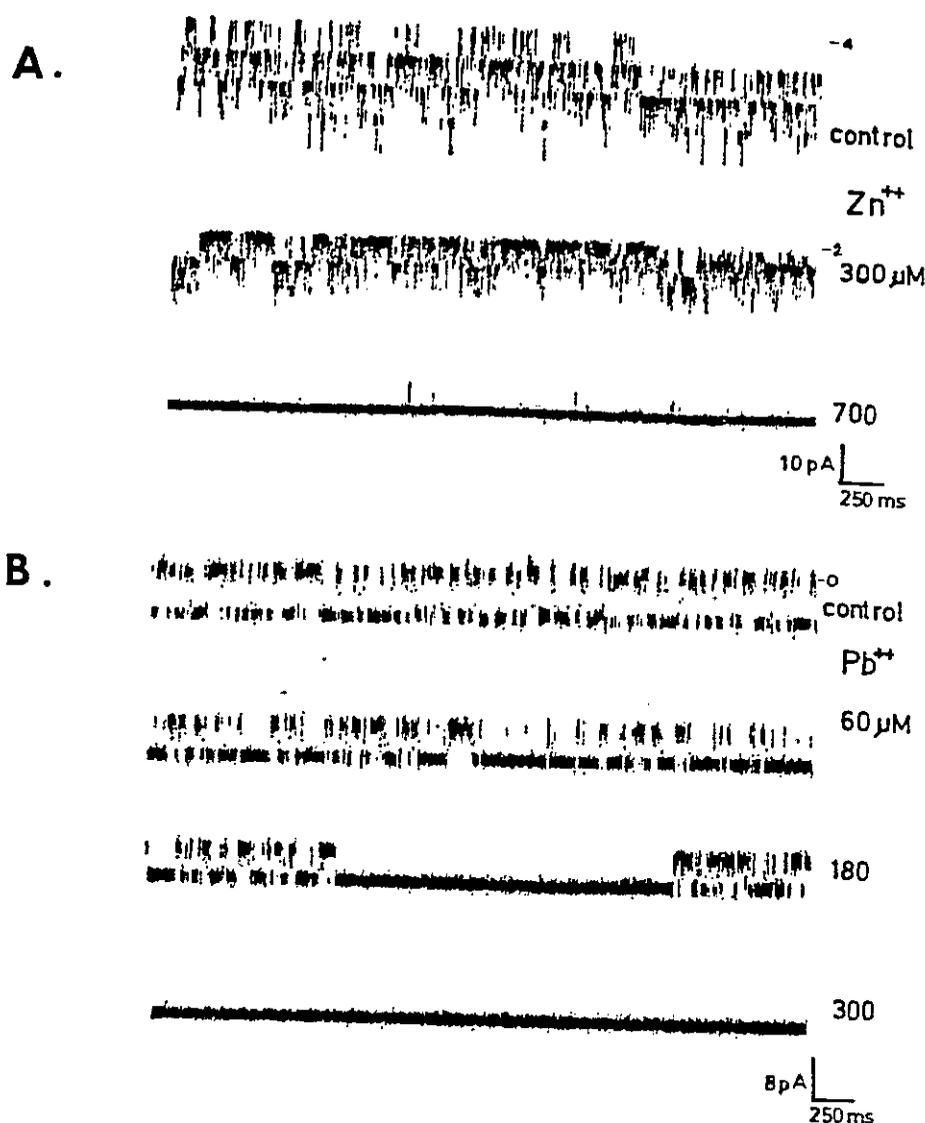


Figura 16  
Efecto de los iones  $Zn^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ .

Los cationes  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  no activan tanto en presencia como ausencia de  $Ca^{2+}$  en la solución. Todos afectan la cinética de apertura y cierre (cuando se los agrega en el lado CIS, pero no por el lado TRANS) y conductancia del canal. Se muestran dos ejemplos en esta figura.

A. Efecto de  $Zn^{2+}$  sobre el lado CIS del canal. En el control hay 4 canales en la membrana,  $V = +40$  mV,  $[Ca^{2+}] = 50$   $\mu M$ , KCl 200 mM. Con 300  $\mu M$  se observa que disminuye el número de canales en la membrana a 2. Con 700  $\mu M$  prácticamente no se observan transiciones.

B. El  $Pb^{2+}$  tiene un efecto similar: baja  $P_o$ .

caso del  $Hg^{2+}$  (a partir de  $\sim 50 \mu M$ ) y  $Zn^{2+}$  (en concentraciones mayores a  $600 \mu M$ ) el efecto es irreversible, es decir, al lavar el lado CIS con la solución control (sin  $X^{2+}$ ), no se recupera la actividad del canal.

El efecto del  $Cu^{2+}$  y del  $Zn^{2+}$  es dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  presente en el lado CIS: a medida que aumenta la  $[Ca^{2+}]$  disminuye gradualmente el efecto inducido por estos cationes. El efecto de  $Hg^{2+}$  es independiente de la  $[Ca^{2+}]$ .

#### Conclusión.

Los resultados de bloqueo de la corriente a través del canal inducido por cationes divalentes, sugieren que el sitio de bloqueo para éstos iones está separado físicamente del sitio de activación en la proteína. Además, considerando la secuencia de bloqueo es posible afirmar que, el sitio de bloqueo tiene características fisicoquímicas muy diferentes al las del sitio de activación.

Los resultados de los cationes divalentes capaces de disminuir  $P_o$ , sugieren que éstos iones son capaces de interactuar con el sitio de activación, sin activar el canal.

## DISCUSION

La discusión se dividirá en dos partes, en las cuáles se discutirán los modelos que sean capaces de explicar la activación por los diferentes cationes divalentes tanto en ausencia y presencia de calcio:

- a) Un modelo para la selectividad de la activación.
- b) Un modelo para la activación en presencia de calcio.

### A) UN MODELO PARA LA SELECTIVIDAD DE LA ACTIVACION.

El propósito de esta sección es construir un modelo para el sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , basado solamente en interacciones electrostáticas entre cationes divalentes y un sitio de unión, que de cuenta de la secuencia de activación observada. Este tipo de modelos se han aplicado exitosamente para explicar la selectividad iónica de electrodos de vidrio, ionóforos artificiales, canales iónicos y membranas biológicas. (Eisenman y Krasne, 1975; Diamond y Wright, 1969; Nachsen, 1985). El modelo se construirá sobre la base de los resultados de la selectividad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ .

Puesto que los resultados obtenidos en esta tesis no permiten concluir sobre si los sitios que unen calcio en el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  son idénticos o distintos, la secuencia de activación observada se considerará, en este tratamiento, como la originada por un sitio que liga  $Ca^{2+}$ .

#### Activación en función del radio iónico.

Los resultados de la selectividad del sitio de unión de  $Ca^{2+}$  muestran que la secuencia de activación del canal para los diferentes cationes divalentes estudiados es:



La figura 17 muestra la activación relativa al  $Ca^{2+}$  en función del radio iónico cristalino de los cationes divalentes. La activación relativa se calcula de la concentración de  $Ca^{2+}$  necesaria para obtener la misma curva de  $P_o$  en función del voltaje que se observa para una concentración de  $X^{2+}$  igual a 200  $\mu M$  (figura 7). Por ejemplo, es necesaria una concentración de  $Cd^{2+}$ , que es aproximadamente 100 veces mayor que la de  $Ca^{2+}$  para obtener el mismo  $P_o$  a un mismo voltaje. Según este gráfico, la efectividad para activar el canal para los distintos

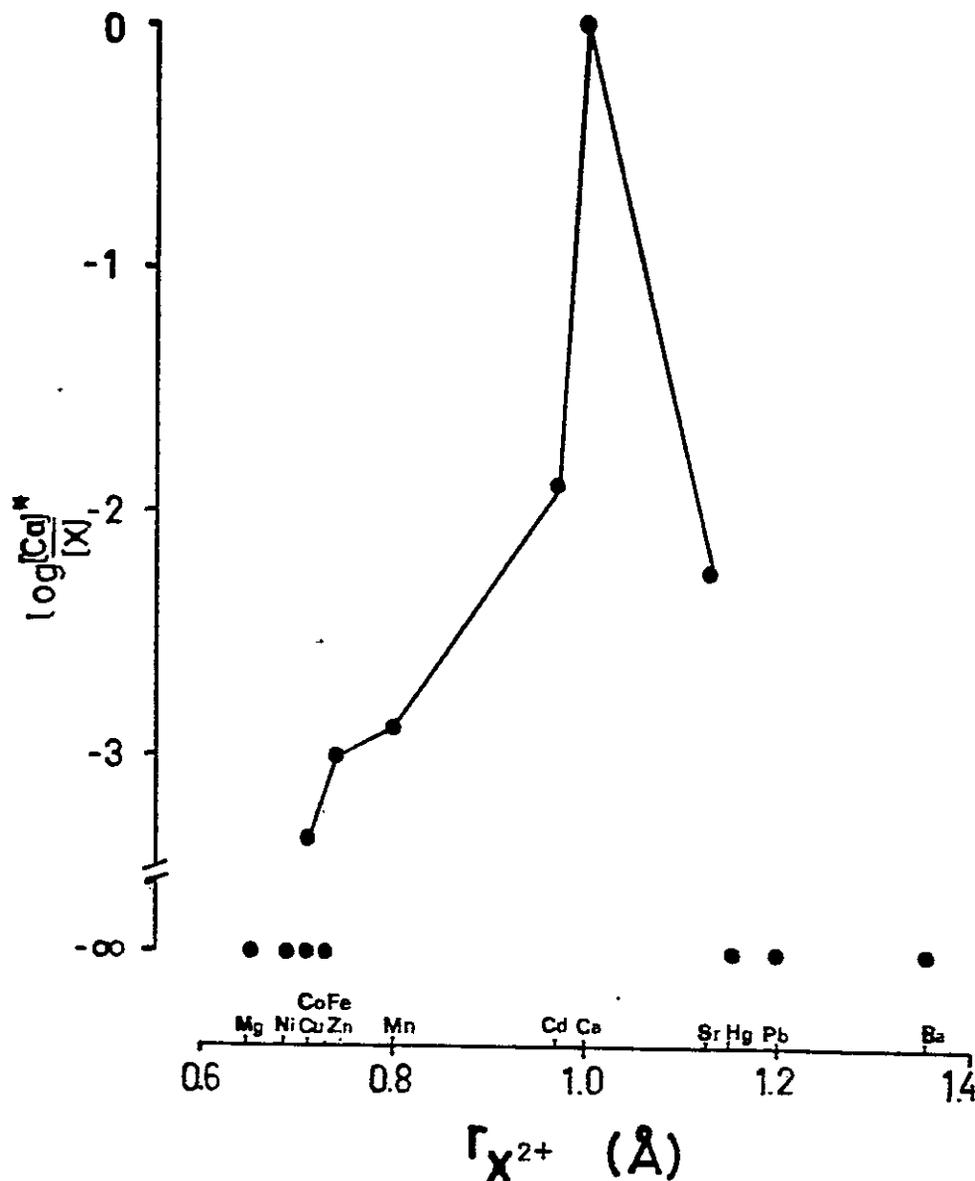


Figura 17  
Activación en función del radio iónico.

Activación en ausencia de  $Ca^{2+}$  en la solución CIS en función del radio iónico de Pauling. Los datos se tomaron del gráfico 7.  $[X^{2+}] = 200 \mu M$ .

La concentración de calcio,  $[Ca^{2+}]^{*}$ , que aparece en la ordenada es la necesaria para obtener la misma curva de P. vs. voltaje que se obtiene a una concentración de  $X^{2+}$  igual a  $200 \mu M$ . Se muestran también los cationes divalentes incapaces de activar el canal.

cationes divalentes es:  $\text{Ca}^{2+}$  (1) >  $\text{Cd}^{2+}$  (0,013) >  $\text{Sr}^{2+}$  (0,005) >  $\text{Mn}^{2+}$  (0,0014) >  $\text{Fe}^{2+}$  (0,001) >  $\text{Co}^{2+}$  (0,0004).

En esta figura se observa además, que los cationes divalentes más efectivos en activar el canal ( $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ ) tienen un radio cercano al del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se puede afirmar que los cationes divalentes cuyo radio iónico está comprendido entre 0,072 nm ( $\text{Co}^{2+}$ ) y 0,113 nm ( $\text{Sr}^{2+}$ ) son capaces de activar el canal. En otras palabras, los cationes divalentes que tienen radios menores a 0,072 nm son muy pequeños para lograr una interacción eficiente con el sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  y los cationes cuyos radios son mayores a 0,113 nm, no penetran en el sitio. Los cationes divalentes incapaces de activar el canal, tienen un diámetro iónico igual o mayor al rango señalado. Por lo tanto, este gráfico da una noción del diámetro del sitio que liga  $\text{Ca}^{2+}$  en esta proteína. Este sitio tendría un diámetro de aproximadamente 0,20 nm.

Esto último, se puede interpretar de la siguiente manera:

El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un diámetro tal, que hace contacto con todos los grupos aniónicos que conforman el sitio, logrando una interacción eficiente. A medida que el radio de los cationes divalentes disminuye respecto al  $\text{Ca}^{2+}$ , éstos interactúan cada vez menos eficientemente con el sitio porque no pueden estar en contacto con todos los grupos aniónicos. En cambio, a medida que el radio de los cationes divalentes aumenta

respecto al  $\text{Ca}^{2+}$ , no se logra un contacto con los sitios aniónicos, porque el ión no puede entrar en el sitio.

Aunque estos resultados indican una característica importante del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ , no es posible deducir otros aspectos estructurales que permitan explicar la secuencia de selectividad encontrada. Utilizando, entonces, la teoría de selectividad de membranas expuesta en la introducción, se intentó obtener información acerca de la estructura de los grupos involucrados en el ligamen de  $\text{Ca}^{2+}$  en este canal.

#### El modelo.

Se usará un modelo electrostático simple, que consiste en dos sitios hipotéticos aniónicos monovalentes, de radio  $r_0$ , separados por una distancia  $D$ .

Las energías de interacción se supondrán de origen solamente electrostático, esto es, derivadas de la ley de Coulomb. Por lo tanto, en este modelo se considerarán a los cationes y aniones como simples esferas con un centro de carga puntual (es decir, se considerarán como esferas rígidas no polarizables y con distribución de carga uniforme). En consecuencia, en el tratamiento teórico, se usarán los cationes divalentes que pertenecen a una misma familia

química (del mismo grupo en la tabla periódica) puesto que tienen propiedades físicas y químicas semejantes, por lo que esta simplificación es razonable. Por ejemplo, en cuanto a las interacciones con el agua o aniones individuales, los cationes alcalino-térreos pueden considerarse como esferas rígidas, que difieren solamente en su radio iónico. En estos cationes la energía de hidratación depende en forma inversamente lineal con el radio iónico (figura 2).

En este tratamiento, las energías de interacción se considerarán iguales a las energías libres de interacción, dado que los cambios entrópicos debido a la interacción entre iones son despreciables (Eisenman, 1962; Truesdell y Christ, 1967).

Finalmente, para aún mayor simplicidad, la constante dieléctrica del medio en el cual interactúan los iones, se supondrá igual a la del vacío ( $\epsilon = 1$ ).

#### Aplicación del modelo a los cationes alcalino-térreos.

Las secuencias de activación del canal encontradas experimentalmente son:



Para encontrar el valor de los parámetros estructurales en el modelo electrostático (estos son,  $D$  (espaciamiento entre

los grupos aniónicos monovalentes) y  $r_s$  (radio de estos grupos)), se calculó la energía libre de unión de los diferentes cationes divalentes al sitio en función de  $r_s$  y  $D$ , usando las ecuaciones 5 y 6 del Apéndice A.

Los resultados de estos cálculos se muestran en la figura 18, en la que se ha graficado la diferencia de energía para el reemplazo del  $\text{Ca}^{2+}$  por los diferentes cationes divalentes.

Se observa que la función es diferente para cada catión divalente, y las líneas se cruzan en varios puntos, originando siete secuencias distintas. El ión con el menor valor para  $\Delta U_{c..1}$  se unirá más fuertemente al sitio aniónico.

Esta figura muestra, también, que el valor de los parámetros es sumamente crítico: pequeños cambios en  $D$  o  $r_s$  (0,005 nm) altera la secuencia de afinidad predicha por el modelo para los cationes alcalino-térreos.

En la tabla IV se muestra que, para obtener la secuencia experimental,  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ , es necesario modelar el sitio de unión como consistente de al menos dos aniones, de radio 0,025 - 0,100 nm, y con un espaciado de 0,200 - 0,214 nm. Fuera de este intervalo no se puede predecir la secuencia observada.

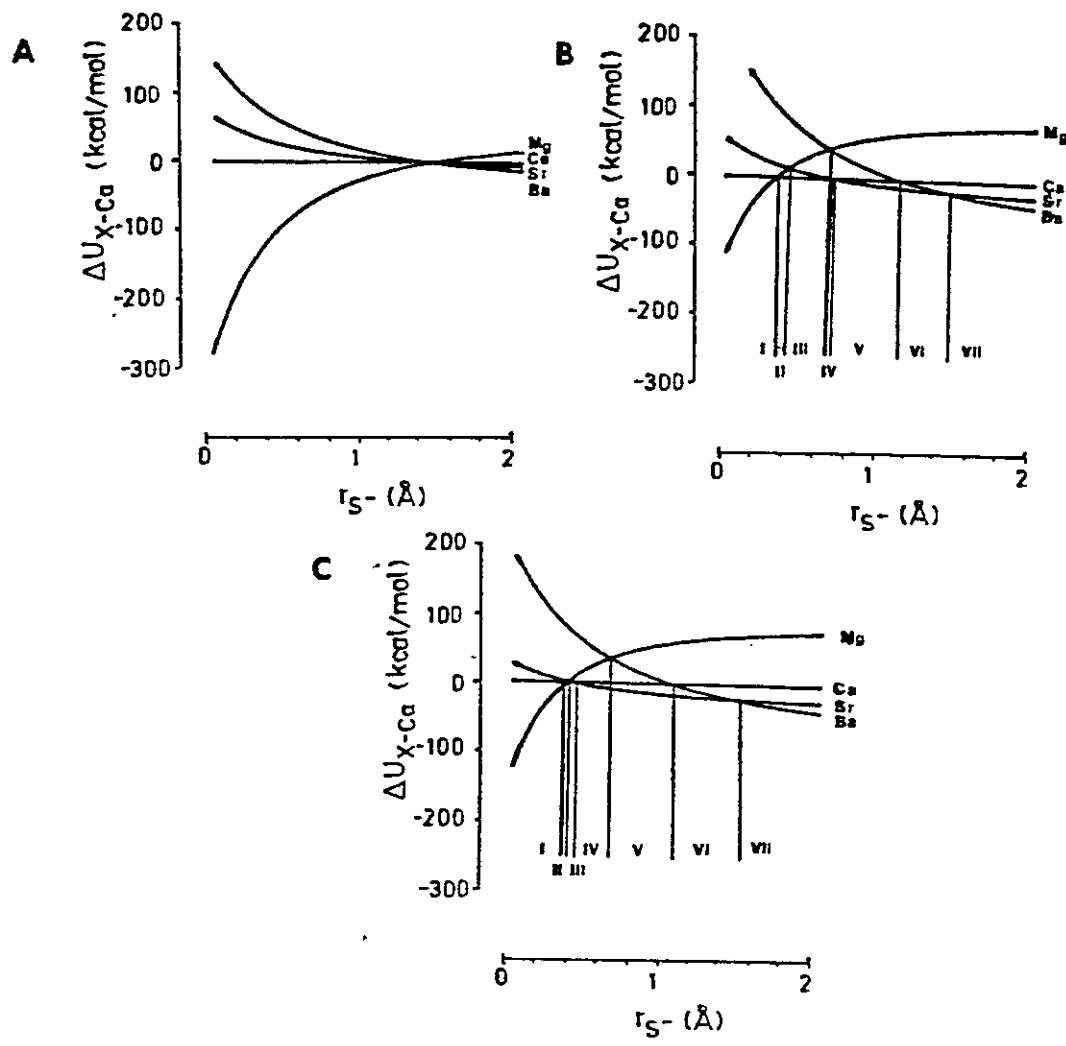


Figura 18

Energía de unión entre los diferentes cationes divalentes alcalino-térreos y dos sitios hipotéticos de carga -1, referida al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Energía libre de intercambio,  $\Delta U_{X-Ca}$ , para la reacción:  $\text{CaS}_2 + \text{X}^{2+} \rightleftharpoons \text{XS}_2 + \text{Ca}^{2+}$ , en función del radio iónico del anión,  $r_s$  (en angstrom). Las energías libres se calcularon usando las ecuaciones 5 - 7 del apéndice A. A)  $D = 1,1 \text{ \AA}$ ; B)  $D = 2,1 \text{ \AA}$ ; C)  $D = 2,15 \text{ \AA}$ . Las líneas verticales en cada grupo de isotermas, indican los límites para las secuencias de selectividad. Se usaron los radios iónicos de Pauling y las energías de hidratación de Marcus y Kertes (1969). (Ver tabla VI, Apéndice A).

Tabla IV  
Radio de los dos grupos aniónicos ( $r_s$ )  
en función del espaciamento (D).

D (nm)	Grupo IIA	$r_s$ (nm)	Grupo IIA'
0,190	no		0,016 - ∞
0,205	0,045 - 0,098		0,018 - ∞
0,210	0,030 - 0,072		0,024 - ∞
0,214	0,025 - 0,026		0,026 - ∞
0,216	no		0,027 - ∞

Esta tabla muestra el rango para  $r_s$  y D en que se puede obtener la secuencia de afinidad experimental. Estas son, para el grupo IIA:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y para el grupo IIA':  $\text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Se observa que para el grupo IIA, pequeñas variaciones (0,005 nm) en la distancia entre los sitios aniónicos producen fuertes cambios en el rango para  $r_s$  en que se obtiene la secuencia experimental. "no" indica que no se obtiene la secuencia experimental e "∞" indica que se obtiene la secuencia experimental para distancias muy grandes. Se usaron los radios de Pauling y las energías de hidratación de Marcus y Kertes (1969) (ver Apéndice A, tabla VI).

Si el espaciamiento tiende a cero (el sitio consiste en un anión divalente) o a infinito (el sitio consiste en sólo un anión monovalente), no es posible predecir la secuencia experimental.

La secuencia observada, para el ligamen de los cationes alcalino-térreos al sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  en el canal, indica que éste tiene ligandos capaces de generar un campo eléctrico intermedio, ni fuerte ni débil.

#### Aplicación del modelo al grupo IIA'.

La figura 19 muestra el resultado de graficar la energía de unión para los cationes divalentes que pertenecen al grupo IIA', referida al  $\text{Cd}^{2+}$ . En este caso, los intervalos para  $r_s$  y  $D$  en el cual es posible predecir la secuencia de activación experimental,  $\text{Cd}^{2+} \gg \text{Hg}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$ , es muy amplia:  $r_s > 0,01$  y  $D \geq 0$  (tabla IV).

En conclusión, el intervalo de valores de  $r_s$  y  $D$  en el cual es posible predecir la secuencia experimental para el grupo del  $\text{Ca}^{2+}$ , también es el adecuado para predecir la secuencia experimental para el grupo del  $\text{Cd}^{2+}$ .

Entonces, se puede concluir que el modelo describe adecuadamente la selectividad de los grupos IIA y IIA', para valores de  $r_s$  en el intervalo de 0,026 a 0,100 nm, y para valores de  $D$  en el intervalo de 0,200 a 0,214 nm.

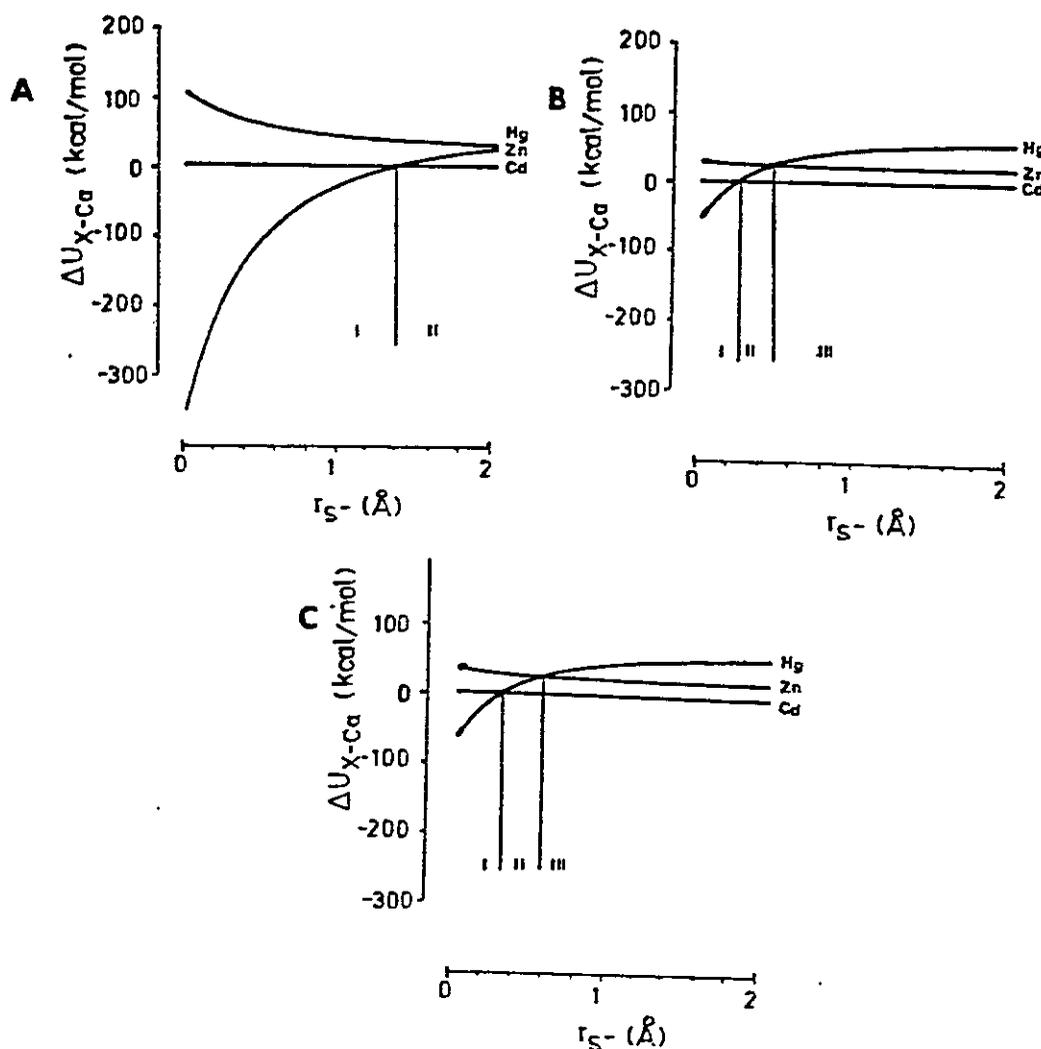


Figura 19

Energía de unión entre los diferentes cationes divalentes del grupo IIA' y dos sitios hipotéticos de carga -1, referida al  $Cd^{2+}$ .

Energía libre de intercambio,  $\Delta U_{X-Ca}$ , para la reacción:  $CdS_2 + X^{2+} \rightleftharpoons XS_2 + Cd^{2+}$ , en función del radio iónico del anión,  $r_s$  (en angstrom). Las energías libres se calcularon usando las ecuaciones 5 - 7. A)  $D = 1,1 \text{ \AA}$ ; B)  $D = 2,1 \text{ \AA}$ ; C)  $D = 2,15 \text{ \AA}$ . Las líneas verticales en cada grupo de isotermas, indican los límites para las secuencias de selectividad. Se usaron los radios iónicos de Pauling y las energías de hidratación de Marcus y Kertes (1969). (Ver tabla VI).

¿Tienen sentido los parámetros estimados por el modelo ?

¿ Son razonables los valores estimados para las energías de unión?. Existen por lo menos dos razones que permiten afirmar que las energías de unión son muy grandes. Estas son:

a) Las energías de intercambio mostradas calculadas del modelo son mucho mayores que las que se pueden deducir de los datos experimentales ( $K_D$  obtenidas a partir de la figura 8). Por ejemplo, la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  es aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M; puesto que  $\Delta U_{\text{Sr-Ca}} = -RT \ln K_D(\text{Ca})/K_D(\text{Sr}) = +38$  kcal/mol, esto implicaría una constante de disociación muy pequeña para el  $\text{Sr}^{2+}$  ( $\sim e^{-50}$ ).

Eisenman, 1962, mostró que la magnitud (pero no la secuencia) en la selectividad es dependiente de la hidratación del sitio de unión. Se ha supuesto, en el tratamiento anterior, que la constante dieléctrica es igual a la del vacío ( $\epsilon = 1$ ). Si se supone que las interacciones entre el catión y el sitio de unión se establecen en un medio parcialmente hidratado, las energías de intercambio serán menores, puesto que dependen inversamente de la constante dieléctrica (ley de Coulomb).

b) El orden de magnitud de la repulsión electrostática que deben experimentar dos aniones en un medio de baja constante dieléctrica, es muy grande: en un medio de constante

dieléctrica igual al vacío, el potencial eléctrico a una distancia de 0,2 nm de una carga negativa es de alrededor de +4 volts (1). En cambio, si la constante dieléctrica es semejante a la del agua (80) el potencial es igual a +60 mV.

Se puede concluir que la interacción entre el catión divalente y el sitio de unión se establece en un medio parcialmente hidratado.

La pregunta que sigue es: ¿son razonables los valores estimados para  $r_s$  y  $D$ ? Como se mostrará a continuación, aparentemente la respuesta es sí. Si se considera el radio de los átomos de oxígeno, fósforo o azufre, unidos covalentemente a un átomo de carbono se encuentra que estos tienen un valor cercano al estimado (0,07, 0,102 y 0,104 nm respectivamente).

La distancia entre los grupos cargados estimada es de aproximadamente 0,2 nm; con distancias mayores no es posible predecir la secuencia de activación experimental. Según este modelo el ion  $Ca^{2+}$  tomaría contacto con ambos grupos cargados. Einspahr y Bugg (1977) (con base en estudios espectroscópicos de estructuras cristalinas que ligan  $Ca^{2+}$ ) concluyen que la distancia promedio de contacto entre el  $Ca^{2+}$  y átomos oxígenos de grupos carboxilos o carbonilos es de alrededor 0,2 nm (para número de coordinación igual a

seis). Esto último implicaría un espaciamiento entre grupos cargados igual a 0,4 nm, que es el doble al estimado por el modelo. Esta diferencia probablemente es un reflejo de la sobresimplificación al suponer un modelo con solamente dos cargas. Al existir más de dos cargas, la fuerza de interacción sería mayor. Es posible lograr que en un modelo de más de dos cargas la fuerza de interacción sea igual a la de un modelo de más de dos cargas, aumentando el espaciamiento entre las cargas aniónicas.

#### Predicción del grupo químico.

Existe información acerca de las características de los ligandos que unen  $\text{Ca}^{2+}$  que permiten sacar conclusiones acerca del grupo químico más común que participaría en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las evidencias son:

- Williams (Williams y col, 1959; Williams, 1978) señala que los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  se relacionan en el hecho de que prefieren el oxígeno como donador de electrones; en cambio los iones  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  prefieren al nitrógeno como donador de electrones.

- Eisenman y Krasne (1975) y Simon y Morf (1973) concluyen que el oxígeno del enlace carbonilo o carboxilo, es un ligando aniónico que es de fuerza de campo intermedia (y por lo tanto genera las secuencias de selectividad III, IV para

cationes divalentes).

- Leavis y Gergely (1984) concluyen con base en las secuencias de aminoácidos de las regiones que ligan  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes proteínas que unen fuertemente el  $\text{Ca}^{2+}$  que, los ligandos que unen  $\text{Ca}^{2+}$  son grupos carboxilos (dos o más) y grupos carbonilos del enlace peptídico.

- Einspahr y Bugg (1977) concluyen con base en datos cristalográficos, espectroscópicos y químicos de 60 estructuras cristalinas, que los ligandos más comunes que participan en la unión de calcio a proteínas son los grupos carbonilos y carboxilos.

Según esta evidencia, es posible postular que los grupos químicos que participarían en la unión de calcio en el sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  en esta proteína son carboxilos y carbonilos. Si consideramos el radio del oxígeno unido covalentemente (p.ej. a un átomo de carbono) encontramos que: el radio del átomo de oxígeno en el enlace simple es 0,074 nm y en el enlace doble es 0,062 nm (Pauling, 1967). Estos datos concuerdan bien con lo que predice el modelo propuesto para el sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  ( $r_s = 0,026$  a  $0,100$  nm).

**Aplicación del modelo a todos los cationes divalentes.**

El modelo trata los iones como cargas puntuales encerradas en una esfera de radio  $r_1$ . Esta simplificación parece ser válida para el tratamiento de la selectividad de iones de un mismo grupo. En esta parte de la discusión se verá si es posible generalizar el tratamiento para todos los cationes divalentes estudiados (aunque, dada la simplicidad del modelo, es poco probable lograr predecir la secuencia de activación experimental para todos los cationes divalentes).

Se usaron diferentes pares de valores para  $D$  y  $r_1$  (siempre en los intervalos mostrados en la tabla IV), con el objetivo de lograr predecir la secuencia de activación para los diferentes cationes divalentes capaces de activar el canal. Se encontró que el modelo que mejor describe los resultados (tanto de los cationes capaces de activar y de los que no lo hacen), contiene dos sitios de ligamen de radio 0,06 nm y espaciados en 0,200 nm.

La figura 20, muestra el resultado de graficar la diferencia entre la energía de interacción y la energía de hidratación para los diferentes cationes divalentes estudiados. La diferencia entre ambas curvas,  $\Delta F_{x-s} = \Delta U_{x-H_2O} - \Delta U_{x-s}$ , indica la selectividad en la unión: mientras menor sea el valor de  $\Delta F_{x-s}$ , más fuerte será la unión del catión

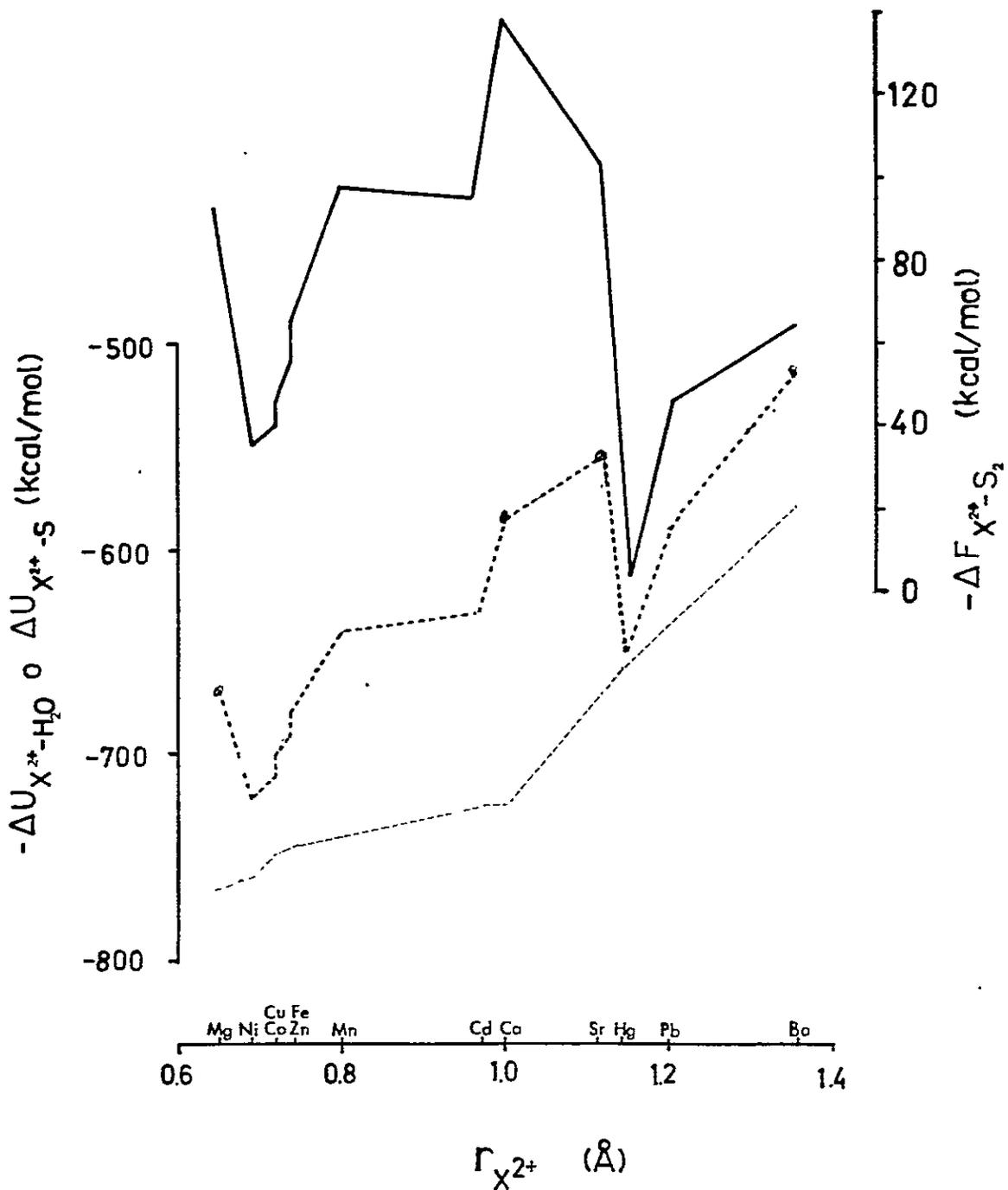


Figura 20  
 Predicción del modelo para todos los cationes divalentes estudiados.

Energías libres de deshidratación ( $-\Delta U_{X^{2+}-H_2O}$ , línea discontinua gruesa) de interacción ( $\Delta U_{X^{2+}-S}$ , línea discontinua fina), y de unión ( $\Delta F_{X^{2+}-S_2}$ , línea continua) para la reacción,  $X^{2+}(H_2O)_n + 2S^- \rightleftharpoons XS_2 + nH_2O$ , en función del radio del catión (en angstrom).  $n$  es el número de moléculas de agua que deben ser removidas para deshidratar a  $X^{2+}$ . Los valores para las energías de hidratación son de Marcus y Kertes (1969), y los radios iónicos de Pauling. (Ver tabla VI.)

divalente con los sitios aniónicos. Se observa que el valor de  $\Delta F_{i-}$ , predicho por el modelo, para los diferentes cationes divalentes, es menor que cero. Esto implica que, según el modelo, todos los cationes divalentes estudiados se deberían unir mejor con el sitio que con el agua. Sin embargo, como ya se discutió (pág. 76) es probable que los valores de  $\Delta F_{i-}$ , estimados por el modelo sean bastante menores en magnitud e incluso algunos mayores a cero, si se considera la constante dieléctrica del medio.

Cationes capaces de activar el canal.

Considerando solamente los cationes divalentes capaces de activar el canal, se observa que el modelo no es capaz de predecir la secuencia de activación experimental. La secuencia predicha es:  $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Cd^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$ , mientras que la experimental fué:  $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$ .

Existen al menos dos limitaciones del modelo que permiten explicar la discrepancia entre la predicción del modelo y los resultados experimentales.

i) El modelo no considera interacciones no electrostáticas, que pueden ser importantes. En el modelo se consideran a los iones y átomos de los grupos químicos como simples esferas cargadas. Esta simplificación se aprecia cuando se comparan la magnitud en la selectividad entre los cationes alcalino-

térreos y los cationes divalentes de transición ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ). En general en los metales de transición las capas de electrones exteriores son "blandas" (i.e. son deformables), tienen asimetría en los orbitales electrónicos, y la propiedad de polarizar los grupos donantes en el sitio de ligamen. Estos factores pueden aumentar las energías de interacción para los metales de transición cuando se los compara con los cationes alcalino-térreos. Es decir, el modelo 'subestima' la interacción de los metales de transición con el sitio.

ii) El modelo no considera que algunos cationes divalentes son capaces de inducir un aumento en el número de Hill, para la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cationes divalentes más efectivos son,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  (tabla II). Por otra parte, el  $\text{Cd}^{2+}$  es el catión que tiene el  $N_w$  más alto, para la activación en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 9).

Los dos factores mencionados, tienden a aumentar la activación teórica por el  $\text{Cd}^{2+}$ , haciendo la secuencia de activación teórica más parecida a la encontrada experimentalmente.

En resumen, el modelo es incapaz de predecir la secuencia observada porque no considera interacciones no electrostáticas, y tampoco considera otros mecanismos de activación del canal.

Cationes incapaces de activar el canal.

La figura 20, también muestra lo que predice el modelo para los cationes divalentes incapaces de activar el canal. Se encontró, experimentalmente que, los cationes  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , y  $Ba^{2+}$  no activan el canal, en ausencia de  $Ca^{2+}$ .

Según el modelo el  $Mg^{2+}$  debería intercambiarse con el  $Ca^{2+}$  tan bien como el  $Mn^{2+}$  y el  $Ba^{2+}$  semejante al  $Fe^{2+}$ . Es evidente que no es posible considerar a los iones como simples esferas cargadas. Si fuera así, la energía libre de hidratación debería ser función exclusiva del inverso del radio iónico. De acuerdo a la figura 20 (línea discontinua gruesa), es claro que la energía de hidratación depende de otros factores (p.ej. momento dipolar, polarizabilidad).

$Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ .

El catión divalente con el menor radio iónico capaz de activar el canal es el  $Co^{2+}$ . El modelo predice que el  $Zn^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$  deberían unirse mejor que el  $Co^{2+}$ . Esto sugiere que estos cationes divalentes son capaces de unirse al sitio de activación, sin activar el canal. Según esto, el  $Zn^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$  deberían competir con el  $Ca^{2+}$  en la activación del canal. La evidencia experimental indica que esto es cierto: estos cationes disminuyen  $P_o$  de manera competitiva con el

$\text{Ca}^{2+}$ .

En el caso de  $\text{Hg}^{2+}$  este efecto es independiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es probable que el  $\text{Hg}^{2+}$  se una a un sitio aniónico no específico en la proteína, produciendo un cambio conformacional irreversible.

#### Predicciones del modelo para otros cationes.

Cationes trivalentes.

Es interesante notar que existen cationes de valencia 3 que tienen un radio iónico similar al  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  (0,104 nm) y  $\text{Tb}^{3+}$  (0,102 nm). El modelo predice que, considerando las energías totales de unión ( $\Delta F_{\text{total}}$ ), los cationes trivalentes se deberían unir fuertemente (tres veces más fuerte que el  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Se encontró que los cationes trivalentes no activan en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta discrepancia puede ser explicada con base en los resultados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos cationes son potentes bloqueadores de la conductancia del canal (figura 15). De acuerdo a un simple modelo de bloqueo en que el bloqueador se une sólo al estado abierto (A), induciendo un estado bloqueado (B):



el bloqueador debería disminuir el tiempo medio que el canal

permanece en el estado abierto pero sin alterar el tiempo medio en el estado cerrado (Woodhull, 1973). Suponiendo que los cationes trivalentes son capaces de unirse al sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  y activar el canal, la cinética de abertura y cierre va a tener componentes de activación y de bloqueo. Por lo tanto aunque los cationes trivalentes sean capaces de activar, no observaremos transiciones al estado abierto del canal, porque se bloquea de inmediato.

También es posible que estos cationes se unan fuertemente al sitio de activación y no activen el canal, porque tienen características químicas distintas a la del  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Cationes monovalentes.

Según el modelo los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  (0,980 nm) y  $\text{K}^+$  (0,133 nm), deberían unirse débilmente al sitio de unión (semejante al  $\text{Mn}^{2+}$ ). El  $\text{H}^+$  ( $\text{OH}_3^+$ , 0,135 nm) debería unirse fuertemente al sitio (semejante al  $\text{Ca}^{2+}$ ).

En este trabajo no se estudió el efecto de cationes monovalentes tanto en ausencia como presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pero las predicciones para estos cationes parecen cumplirse, según los resultados de trabajos realizados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en este canal ( $\text{Na}^+$ , Naranjo (resultados no publicados);  $\text{K}^+$ , Vergara (1983);  $\text{H}^+$ , Cook y col. (1984) y Laurido (resultados no publicados)). Todos estos iones disminuyen  $P_o$  ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en concentraciones mM y  $\text{H}^+$  en concentraciones  $\mu\text{M}$ ),

por el lado CIS y no por el lado TRANS del canal (por lo menos  $K^+$  y  $H^+$ ), probablemente compitiendo con el  $Ca^{2+}$  en el proceso de activación.

Una predicción aún no comprobada del modelo, se relaciona con el pH. Es probable que los protones tomen contacto con los grupos aniónicos que participan en la unión de  $Ca^{2+}$ , reduciendo así la carga negativa efectiva que siente un catión divalente (efecto pantalla). Por lo tanto, al bajar el pH debería cambiar la secuencia de selectividad del canal, al disminuir la fuerza del campo eléctrico en los sitios aniónicos, a una secuencia de campo más débil (i.e., secuencia I:  $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ ).

En resumen:

- Los cationes monovalentes se unen al sitio de activación, pero no activan el canal porque tienen una carga eléctrica menor a la del  $Ca^{2+}$ .
- Es probable que los cationes trivalentes se unan fuertemente al sitio de activación pero no se observa activación porque también se unen fuertemente a un sitio en la vía de conducción de iones  $K^+$ .

### Comparación con otros modelos.

Un modelo muy semejante al usado aquí fué usado por Nachsen, 1984, para explicar la selectividad de la inhibición por cationes divalentes y trivalentes de los flujos de calcio en sinaptosomas de cerebro de rata. Nachsen usó la misma serie de cationes divalentes a la usada en este trabajo, y el mismo tratamiento teórico. Este autor llegó a las siguientes conclusiones:

- los bloqueadores inhiben el influjo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  debido a que compiten con el  $\text{Ca}^{2+}$  por un sitio que participa en la conducción de cationes divalentes, en el canal de calcio,
- la secuencia de efectividad de bloqueo para los cationes alcalino-térreos es:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  (esta secuencia corresponde a la secuencia de selectividad V de la segunda columna de la tabla V del apéndice A),
- con base en la secuencia de selectividad para los cationes del grupo IIA, este autor concluye que el sitio consiste en dos aniones de 0,1 nm de radio con una separación de 0,2 nm. Este modelo no predice la secuencia de unión observada para los metales de transición.

Es posible concluir, que el modelo usado no es completo. Este modelo predice que mientras más pequeño es el catión más fuertemente se unirá a uno de los grupos

aniónicos (ver figura 20, línea punteada fina). Claramente, esto no es correcto puesto que, independiente del valor del espaciamiento y del radio de los grupos, el modelo será incapaz de generar la secuencia encontrada experimentalmente. Esto se debe al suponer los cationes divalentes como esferas con toda la carga eléctrica en su centro.

Un modelo más realista debe suponer que los cationes divalentes más pequeños que el calcio, deben interactuar más débilmente que el calcio con el sitio. En este modelo se debe suponer que el catión es una esfera con distribución no uniforme, es decir, debe considerarse como una esfera con varios puntos de coordinación en su superficie (el número de coordinación para el  $\text{Ca}^{2+}$  es igual a 6: puede establecer seis enlaces coordinados, con una geometría octahédrica).

De esta manera, el catión capaz de interactuar en forma eficiente con los grupos cargados, es aquel que tiene un radio tal que contacta con todos ellos.

Aunque este último modelo es más correcto, es bastante más complejo, y por esta razón no se usará en esta tesis.

### Troponina C.

En esta etapa de la discusión es importante introducir a la troponina C, puesto que en cuanto a su unión de  $\text{Ca}^{2+}$  esta proteína tiene características semejantes al canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ . La troponina C es la subunidad receptora de  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponina (proteína que participa en el mecanismo de la contracción del músculo esquelético de vertebrados).

Esta proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  tiene la siguiente secuencia de unión para cationes divalentes:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$  (resultados para el intercambio de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (unido a troponina C) en presencia de  $\text{X}^{2+}$  a 0,1 mM, pH 7; Fuchs, 1971). Este autor encontró que el intercambio no es significativo para los iones:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . El gráfico para el % de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  intercambiado en función del radio iónico es muy similar al gráfico 18. Además, el mismo autor encontró que los iones lantánidos trivalentes tienen una afinidad relativa similar a la del  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , y los cationes monovalentes alcalinos ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) prácticamente no desplazan al  $\text{Ca}^{2+}$  del sitio receptor.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos en este trabajo para el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , con excepción del  $\text{Pb}^{2+}$  y los cationes trivalentes (no se puede descartar que estos iones se unan al sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$  en el canal,

pero sean incapaces de activar).

La calmodulina es otra proteína que une calcio, con características semejantes. Esta proteína une los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , pero no une los cationes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  (Klee y col, 1980).

Es posible entonces postular que el sitio receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas proteínas y en el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , tienen características fisicoquímicas muy semejantes (además la constante de afinidad aparente para  $\text{Ca}^{2+}$  a pH 7,0, para estas proteínas es  $1 \times 10^{-6}$  M). De estas proteínas se conoce la secuencia de aminoácidos e incluso se ha podido construir la posible estructura tridimensional (Leavis y Gergely, 1984). La secuencia de aminoácidos de la troponina C (C) de conejo, revela que esta consiste de una cadena polipeptídica de 159 residuos (17846 dalton), y que posee cuatro regiones homólogas en la secuencia que corresponderían a los cuatro sitios que unen  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales también son homólogos a regiones similares descritas en otro grupo de proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (parvalbúminas, calmodulinas). La región que participa en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene alto contenido de residuos ácidos, siendo el residuo del ácido glutámico el más frecuente. Según el modelo de Kretsinger (Kretsinger y Nockolds, 1973; Tufty y Kretsinger, 1975), el  $\text{Ca}^{2+}$  se uniría a un 'bolsillo' de esta región, interactuando con seis átomos de oxígeno (el  $\text{Ca}^{2+}$  mantiene

una geometría de coordinación octahédrica en solución acuosa) provenientes de grupos carboxilos de los residuos de ácido glutámico y <sup>alifático</sup> glutámico. Este modelo aparentemente es válido para todas las proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (Leavis y Gergely, 1984).

#### Ubicación física del receptor para $\text{Ca}^{2+}$ en el canal.

Moczydlowski y Latorre (1983a) proponen que la zona física para los sitios que unen  $\text{Ca}^{2+}$  es distante a la boca de acceso y a la vía de conducción para los iones  $\text{K}^+$ . Comparando la dependencia de la cinética de activación a la  $[\text{Ca}^{2+}]$  y la dependencia de la conductancia a la  $[\text{K}^+]$ , al incorporar el canal en membranas con lípidos cargados y membranas con lípidos neutros, encontraron que los sitios que ligan  $\text{Ca}^{2+}$  son más sensibles al potencial de superficie que los sitios de conducción de  $\text{K}^+$  (Moczydlowski y col, 1985). Esto sugiere que los sitios de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  están más cercanos a las cabezas de fosfolípidos que los sitios de conducción de  $\text{K}^+$ , y por lo tanto implica que son zonas separadas en la proteína.

Los resultados de bloqueo de este canal por cationes divalentes concuerdan con esta idea, puesto que la selectividad para la unión de cationes divalentes del sitio en la vía de conducción del canal (secuencia VI) es muy

distinta al sitio de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  (secuencia IV).

Esta evidencia indica que el receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  está separado de la vía de conducción de iones  $\text{K}^+$ .

#### Comparación con otros canales de $\text{K}^+$ activados por $\text{Ca}^{2+}$ .

Como se mencionó en la introducción, en prácticamente todas las membranas celulares estudiadas, un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, aumenta la permeabilidad a iones  $\text{K}^+$ . Este efecto lo descubrió Gardós (1958), en eritrocitos humanos. Estudios de flujos de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  indican que los cationes divalentes,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  también son capaces de producir el mismo efecto, cuando se los inyecta al medio interno del eritrocito (Heinz y Passow, 1980).

Grygorczyk y Schwarz (1983) encontraron un canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en eritrocitos humanos, usando la técnica de "patch-clamp". Este canal tiene una conductancia máxima de 40 pS, es débilmente dependiente del voltaje y además puede ser activado por  $\text{Pb}^{2+}$  (en concentraciones 100 veces mayores que el  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Aparentemente este canal es distinto al canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  de TT, en cuanto a sus características de conducción y selectividad del sitio que une  $\text{Ca}^{2+}$ .

La secuencia de selectividad encontrada es muy semejante a la encontrada por Gorman y Hermann (1979) y Meech (1978) para la activación de las corrientes de  $K^+$  en neuronas de molusco, con excepción de  $Hg^{2+}$  ( $Ca^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+}$ ). Estos autores concluyen que la efectividad en la activación parece estar relacionada con el radio iónico: iones con radios entre 0,076 y 0,113 nm pueden activar la corriente de  $K^+$ . Sin embargo, no es posible cuantificar las diferencias reales en efectividad debido a que existe muy poca información acerca de la capacidad del citoplasma para tamponar los diferentes cationes divalentes probados. Aunque no se conoce la conductancia de este canal, la selectividad a la conducción de iones es muy similar al canal de TT.

McManus y Magleby (1984) usando la técnica de "excised patch" en células musculares de rata en cultivo, encontraron que el  $Sr^{2+}$  puede reemplazar al  $Ca^{2+}$  en la activación de canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ . Estos autores señalan que el ión  $Sr^{2+}$  es capaz de activar el canal en concentraciones ~200 veces mayores que el  $Ca^{2+}$ , con un número de Hill de 1,2 a 2,0 (las soluciones internas y externas no tienen  $Mg^{2+}$ ), y con un comportamiento cinético muy similar a la activación por  $Ca^{2+}$  (el número de Hill para la activación por  $Ca^{2+}$  es de ~2,5). Estos resultados son idénticos a los encontrados

en este trabajo para el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de TT de rata. Además las características de conducción son muy similares al canal de TT (Latorre, 1986).

Aparentemente existen a lo menos dos familias distintas de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  que difieren en cuanto a sus características de conducción y selectividad a la activación por cationes divalentes.

**Conclusión general.**

Se encontró una serie de cationes divalentes que activan el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ . El proceso de activación es idéntico al inducido por el  $Ca^{2+}$  (dependencia al voltaje, dependencia a la concentración de catión activador,  $N_w$ , cinética de abertura y cierre). Usando esta serie se construyó un modelo para el sitio de ligamen de  $Ca^{2+}$ , basado solamente en interacciones electrostáticas entre los cationes divalentes y sitios aniónicos de unión. Este modelo da cuenta de la secuencia de afinidad para los cationes divalentes que pertenecen a una misma familia química. Las características estructurales aproximadas para el sitio que une calcio, son: 0,06 nm para el radio de los dos grupos cargados y 0,20 nm para el espaciado entre estos. Sin embargo, el modelo es incapaz de predecir la secuencia de afinidad experimental para todos los cationes divalentes estudiados. Es necesario considerar otras contribuciones, como el aumento del  $N_w$  inducido por algunos cationes divalentes, e interacciones no-electroestáticas entre los cationes divalentes y los sitios aniónicos. El modelo predice correctamente el efecto que tienen los cationes monovalentes sobre la activación en presencia de  $Ca^{2+}$ . Considerando los resultados en conjunto (cationes capaces de activar, cationes incapaces de activar, cationes

monovalentes), es posible afirmar que las interacciones electrostáticas son el componente más importante que determina la selectividad de activación en esta proteína. A partir de consideraciones de la química de algunos cationes divalentes en solución acuosa y de las similitudes fisicoquímicas de esta proteína con la troponina C, se postula que los grupos químicos que participarían en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  son carboxilos (de residuos de ácidos glutámico y aspártico) y carbonilos (del enlace peptídico).

## B) ACTIVACION EN PRESENCIA DE CALCIO.

El resultado más relevante encontrado para la activación por cationes divalentes en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , es la activación por  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  (activan sólo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

En esta parte de la discusión se intentará validar el modelo propuesto en la sección de Resultados para la activación por  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , analizando otros mecanismos posibles. Además se discutirá el posible rol fisiológico del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la base de los resultados obtenidos para la activación en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ .

### Mecanismos posibles para la activación por $\text{Mg}^{2+}$ y $\text{Ni}^{2+}$ .

Es posible postular al menos tres mecanismos por los cuales el  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  activan sólo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ :

- i) aumento de la afinidad de los sitios por  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- ii) aumento del potencial de superficie,
- iii) aumento del número de sitios sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  que participan en el proceso de abertura del canal.

La discusión de los mecanismos se centrará en los resultados obtenidos para el  $\text{Mg}^{2+}$ , los que se muestran en la figura 13.

El primer mecanismo implica una disminución en las constantes de disociación  $K_1$  o  $K_2$  (aumento de afinidad) en el modelo planteado por Moczydlowski y Latorre (1983a, ver figura 21C), esto es, postulando que el  $Mg^{2+}$  es capaz de modificar las constantes de unión de  $Ca^{2+}$  (producto de la unión del  $Mg^{2+}$  al sitio de  $Ca^{2+}$  o la unión a un sitio de modulación alostérica de los sitios que unen  $Ca^{2+}$ ). Usando la ecuación (3) deducida en ese trabajo, la cual relaciona  $P_0$  con  $K_1$  y  $K_2$ , es posible dilucidar si el  $Mg^{2+}$  modifica alguna de estas constantes. En la figura 21A-1 se muestra una simulación para esta ecuación, cuando se aumenta  $K_1$  en relación a  $K_2$  y en la figura 21A-2 cuando se aumenta  $K_2$  en relación a  $K_1$ . Se aprecia que el modelo A-1 ajusta mejor a los datos experimentales (figura 21B). Por lo tanto, según este modelo, el  $Mg^{2+}$  aumenta la constante de afinidad para la entrada del segundo  $Ca^{2+}$  ( $K_2$ ) más que la constante para la entrada del primer  $Ca^{2+}$  ( $K_1$ ). Además, esto concuerda con el hecho de que el  $Mg^{2+}$  aumente la constante de afinidad aparente para la unión de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, este modelo predice un aumento del número de Hill de sólo un 10% respecto al control cuando hay  $Mg^{2+}$  4 mM (usando los valores para las constantes de disociación predichas por este modelo; ver figura 21). Experimentalmente, se encontró que el  $Mg^{2+}$  4 mM aumenta el  $N_H$  en un 200%.

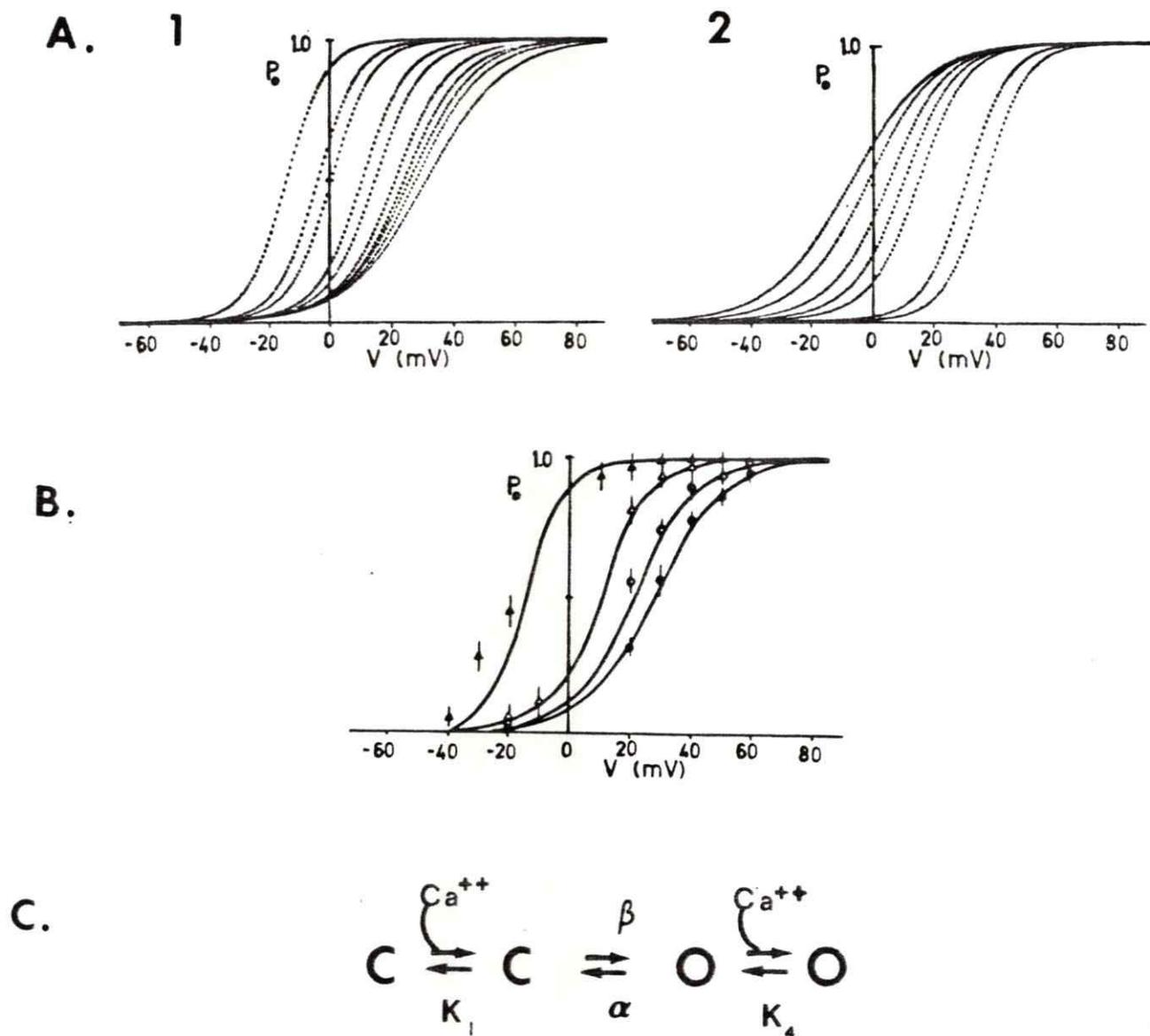


Figura 21

Efecto de la variación de las constantes de afinidad de los sitios de unión de  $Ca^{2+}$ .

A. Efecto de la variación de la razón de las constantes de disociación,  $K_1$  y  $K_4$  en el modelo de Moczydlowski y Latorre (1983; fig. 21C). A-1) Variación de  $K_4$  en relación a  $K_1$  ( $= 0,2$  mM,  $K_4$  disminuye hacia la derecha), i.e., aumenta la afinidad para la entrada del segundo  $Ca^{2+}$ . A-2) Aumento de la afinidad para la entrada del primer  $Ca^{2+}$ .

B. Gráfico de  $P_0$  en función de  $V$ , donde se muestran los datos experimentales (● = control (10  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  CIS, KCl 200 mM); ○ = 1 mM  $Mg^{2+}$  CIS; △ = 2 mM  $Mg^{2+}$  CIS; ▲ = 4 mM  $Mg^{2+}$  CIS) y curvas predichas por el modelo A-1 (control,  $K_4 = 13$   $\mu$ M; 1 mM,  $K_4 = 5$   $\mu$ M; 2 mM,  $K_4 = 0,5$   $\mu$ M; 4 mM,  $K_4 = 0,01$   $\mu$ M).

En el segundo mecanismo se debe postular que la proteína tiene cargas negativas en la superficie citoplasmática. Las cargas positivas que se agregan, aumentarían la diferencia de potencial a través de la proteína, al unirse a las cargas negativas (Moczydlowski y col, 1985). Además, se debe suponer que estas cargas unen sólo el  $Mg^{2+}$  y no el  $Ca^{2+}$ . Al agregar 5 mM  $Mg^{2+}$  en el lado CIS (figura 13) se observa un corrimiento hacia la izquierda de la curva de P. en función de  $[Ca^{2+}]$ , lo que está de acuerdo con un aumento del potencial a través de la membrana (aumenta la activación); sin embargo este mecanismo propuesto no es correcto, puesto que no predice un aumento en  $N_H$ .

Por lo tanto, el modelo que describe los resultados más satisfactoriamente, es el (iii). Como ya se mencionó (en la sección de Resultados), en este modelo  $Mg^{2+}$  interactúa con un sitio en la proteína que es topográficamente distinto a los sitios que unen  $Ca^{2+}$ . En este caso el número de Hill, es el límite inferior del número de sitios que participan en la unión de  $Ca^{2+}$  (Leviztki, 1978).

En conclusión, lo más sencillo es pensar que el  $Mg^{2+}$  'desenmascara' nuevos sitios para  $Ca^{2+}$  en la proteína, homólogos a los que existen en ausencia de  $Mg^{2+}$ . Es probable que, en forma paralela, el  $Mg^{2+}$  también aumente la constante de afinidad de los sitios que unen  $Ca^{2+}$  via modulación

alostérica.

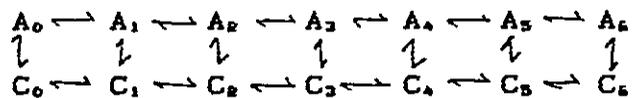
¿ Porqué aumenta  $N_H$  al aumentar la  $[X^{2+}]$  ?

Los resultados mostrados para activación por  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ , revelan que el valor de  $N_H$  es dependiente de la concentración de éstos cationes en el lado citoplasmático del canal: éste tiende a aumentar a medida que se aumenta la concentración de  $Mg^{2+}$ . Esto es explicable si se piensa que el sitio modulador tiene una cierta constante de afinidad para estos iones y que mientras mayor sea esta constante, mayor será el valor para el  $N_H$ . Al aumentar la concentración de  $X^{2+}$ , simplemente, se está aumentando la probabilidad de que el sitio esté ocupado.

Consecuencia mecanicista del aumento de  $N_H$  inducido por  $X^{2+}$ .

El canal de potasio activado por calcio tiene más sitios de activación por  $Ca^{2+}$  de los que se imaginaban hasta ahora. El valor máximo encontrado para  $N_H$  es de 3,6 (en "patch" aislado de mioesferas, en soluciones sin  $Mg^{2+}$ ; McManus y Magleby, 1985), y el valor mínimo es de 1,2 para el canal de TT incorporado en bicapas planas (Moczydlowski y Latorre, 1983a). En esta tesis se encontraron valores de  $N_H$  de hasta 5,8 en presencia de  $Mg^{2+}$ , lo cual implica la

existencia de a lo menos 6 sitios que participan en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y , por lo tanto, en la activación de este canal. Esta idea es consistente cualitativamente con un modelo de seis sitios. Se puede imaginar que el canal une seis  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el estado abierto (A) como en el estado cerrado (C).



Es posible ajustar las distintas constantes de equilibrio para cada etapa de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera de obtener números de Hill entre 1 y 6. El  $\text{Mg}^{2+}$  podría cambiar estas constantes de unión, haciendo así más sigmoidea la curva de activación. Además, estos resultados son consistentes con los estudios cinéticos realizados por McManus y Magleby (1985), en el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  de miosferas de rata. Estos autores proponen un modelo que contiene al menos seis estados cerrados y tres estados abiertos.

### Modelo para la activación por $Mg^{2+}$ .

Los resultados en presencia de  $Ca^{2+}$ , sugieren la existencia de un sitio modulador (sitio 'M') y de un sitio de activación (sitio 'C'), en el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ .

Los iones  $Sr^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se unirían solo al sitio de activación (puesto que no aumentan  $N_H$ ), los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  se unirían sólo al sitio de modulación (puesto que no activan en ausencia de  $Ca^{2+}$ ), y los iones  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  podrían unirse a ambos sitios.

### Características del sitio 'M'.

Las características de selectividad del sitio modulador se puede inferir con base en los números de Hill para la activación por  $Ca^{2+}$  en presencia de cationes divalentes (tabla II). Se supondrá que mientras mayor sea la afinidad del sitio 'M' por los diferentes cationes divalentes, mayor será el  $N_H$  inducido por éstos. Entonces, con base en la efectividad de aumentar el  $N_H$ , la secuencia de afinidad del sitio 'M' es:



Considerando los cationes alcalino-térreos, se observa que el  $Mg^{2+}$  se une mejor al sitio que el  $Ca^{2+}$ . Se puede inferir

que el sitio modulador contiene ligandos capaces de generar un campo eléctrico fuerte (secuencia I en la tabla V (Apéndice A)), donde prima la interacción con los ligandos.

De acuerdo a estas simples consideraciones, se puede concluir que, el sitio modulador tiene características fisicoquímicas diferentes al sitio de activación.

#### Comparación con otras proteínas que ligan $\text{Ca}^{2+}$ .

Es sabido que varias proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$ , también unen  $\text{Mg}^{2+}$  (Leavis y Gergely, 1984). Por ejemplo, la troponina C tiene dos sitios específicos para  $\text{Ca}^{2+}$  y otros dos sitios de baja afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  que también ligan  $\text{Mg}^{2+}$ . En esta proteína y en otras proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (calmodulina), los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen en forma cooperativa. Por otra parte, en estas proteínas el  $\text{Mg}^{2+}$  no aumenta la cooperatividad en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sin embargo, los resultados de esta tesis indican que el  $\text{Mg}^{2+}$  no compite, ni sustituye al  $\text{Ca}^{2+}$  en la activación del canal, sino que se comporta como un efector alostérico al aumentar la cooperatividad en la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ : el  $\text{Mg}^{2+}$  se uniría a un sitio distinto al cual se une el  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo el 'desenmascaramiento' de nuevos sitios para  $\text{Ca}^{2+}$ .

Esto indica que, el receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , en este aspecto es diferente de las demás proteínas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Rol fisiológico del $\text{Mg}^{2+}$ .

Los resultados obtenidos tanto en bicapas artificiales como en "patch-clamp", indican que en condiciones fisiológicas (concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , potencial eléctrico de reposo), la actividad del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  sería muy baja. La actividad de este canal también sería despreciable aún durante el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que sigue a un potencial de acción dada la rápida hiperpolarización celular.

Los resultados de esta tesis indican que en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  el canal es mucho más sensible a pequeños cambios en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un  $N_w$  igual a 5, significa que  $P_o$  aumenta al doble al variar sólo un 15% la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Puede imaginarse que el receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la proteína a la manera de un interruptor. La proteína tendría sólo dos estados: conductora (a nivel de saturación) y no conductora. La concentración total de este ión en el citoplasma de la mayoría de las células es del orden de 10 mM de la cual el 10% está libre (Erdos y Maguire, 1983).

Aunque no se conoce la  $[\text{Mg}^{2+}]$  en células musculares, es

posible suponer que las concentraciones de  $Mg^{2+}$  usadas en este estudio (2-10 mM) son fisiológicas, según los resultados mostrados por Moczydlowski y col. (1985). Estos autores mostraron que el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de TT incorporado en membranas que contienen fosfolípidos cargados negativamente, es aproximadamente 10 veces más sensible al  $Ca^{2+}$ , que en membranas neutras (como las usadas en esta tesis). En general, las membranas celulares tienen cargas negativas fijas en su superficie (provenientes de lípidos y proteínas cargadas). Por lo tanto, es razonable suponer que este canal es menos sensible al  $Mg^{2+}$  en membranas con lípidos neutros que en una membrana celular, debido al efecto del potencial de superficie.

Por lo tanto, es muy probable que éste canal iónico contribuya a la hiperpolarización celular posterior a un potencial de acción, en células esqueléticas. También, es probable que aún en las condiciones de potencial de reposo ( $\sim -60$  mV), manifieste actividad, producto de un leve aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (p. ej. eflujo de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico). Esta hipótesis podría ser comprobada realizando registros de la actividad de éste canal en células esqueléticas "in vivo", usando la técnica de "patch-clamp".

## Apéndice A

## Formulación del modelo.

Una condición suficiente para que existan diferentes secuencias de selectividad de un sitio de unión (S) por cationes, es que la energía de interacción entre el sitio y el catión tenga una dependencia del radio del catión distinta a la energía de interacción del catión con el agua (Eisenman, 1962). La secuencia de selectividad particular que surge del sitio depende de su fuerza de campo, la cual, en un modelo electrostático, se puede representar por su radio efectivo ( $r_s$ ).

Con el objetivo de calcular la energía de interacción entre el catión divalente en la solución acuosa y el sitio de unión, se propondrá un modelo electrostático. En este modelo se describirá el sitio de unión como uno o dos sitios aniónicos. Tanto los sitios aniónicos como los iones se describirán como cargas puntuales encerradas en esferas, de radio  $r_s$  para el sitio y  $r_i$  para el ión.

El potencial eléctrico a una distancia  $d$  generado por un sitio monovalente, en el vacío es,

$$V = e/4\pi\epsilon_0 d, \quad (1)$$

en que  $e$  es la carga del electrón,  $\epsilon_0$  es la permitividad absoluta del vacío y  $d$  es la distancia medida desde el centro del sitio. Este potencial eléctrico es, por definición, el cambio de energía potencial asociada a traer una carga unitaria positiva desde el infinito hasta una distancia  $d$  del sitio.

Al poner en contacto un ión positivo, de radio  $r_1$  con un sitio de radio  $r_2$ , la distancia a que quedan las cargas es  $r_1 + r_2$  y la energía será,

$$\Delta U = e^2/4\pi\epsilon_0 (r_1 + r_2). \quad (2)$$

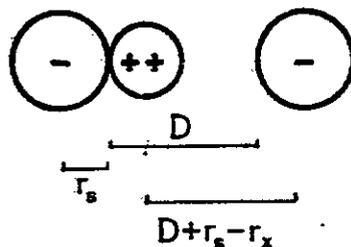
Para el caso de un sitio de valencia  $z^-$  y un ión de valencia  $z^+$ , la energía es,

$$\Delta U = (e^2/4\pi\epsilon_0) z^- z^+ / (r_1 + r_2). \quad (3)$$

Es conveniente expresar esta energía en kcal/mol  $\times \text{Å}$ . Introduciendo el número de Avogadro y recordando que 1 erg =  $1,46 \times 10^{13}$  kcal/mol, la energía es,

$$\Delta U = - 332 z^- z^+ / (r_x + r_s). \quad (4)$$

Para el caso de un ión divalente y dos sitios monovalentes,



la energía asociada a traer el catión a estar en contacto con un sitio y aproximar el segundo sitio a una distancia  $D$ , se compone de tres términos:

$$- 332 z^- z^+ / (r_x + r_s),$$

que es la energía debida a la interacción con el sitio que entra en contacto,

$$- 332 z^- z^+ / (D + r_s - r_x),$$

que es la energía de interacción con el sitio que no está en contacto, y finalmente,

$$+ 332 z^- z^+ / (D + 2r_s),$$

que es la energía de interacción entre los dos sitios.

Los dos primeros términos son negativos que representan la atracción entre cargas de distinto signo, y el tercer término es positivo por la repulsión entre las dos cargas negativas.

La energía de interacción es entonces:

$$\Delta U = 332 \left[ -2/(r_x + r_s) + (-2/(D + r_s - r_x)) + 1/(D + 2r_s) \right]. \quad (5)$$

En el caso en que el diámetro del catión sea igual o mayor que D, la geometría es:



En este caso, el catión está en contacto con ambos sitios y la energía es:

$$\Delta U = 332 \left[ -4/(r_s + r_x) + 1/(D + 2r_s) \right]. \quad (6)$$

El cambio de energía asociado a traer un mol de iones desde la solución hasta el sitio implica primero sacar los iones del agua y luego ponerlos en contacto con el sitio. La energía del primer paso ( $\Delta U_{x-H_2O}$ ) se puede obtener de la

literatura (ver tabla VI) y la segunda ( $\Delta U_{x-s}$ ) se calcula del modelo, suponiendo valores para  $r_s$  y  $r_x$ .

La selectividad de un sitio aniónico por dos cationes depende de la diferencia entre la energías de interacción entre los cationes y el sitio (se deriva de las ecuaciones 5 y 6) y la del catión y el agua. Entonces, la selectividad de un par aniónico por  $X^{2+}$  relativo al  $Ca^{2+}$ , estará dada por la energía libre ( $\Delta U_{x-c_s}$ ) para el intercambio,  $CaS_2 + X^{2+} \rightleftharpoons XS_2 + Ca^{2+}$ :

$$\Delta U_{x-c_s} = (\Delta U_{x-H_2O} - \Delta U_{x-s}) - (\Delta U_{Ca-H_2O} - \Delta U_{Ca-x}). \quad (7)$$

Las figuras 18 y 19 muestran gráficos de  $\Delta U_{x-c_s}$  en función de  $r_s$ , para los cationes alcalino-térreos y metales divalentes del grupo IIA', para tres valores de D: A) 0,110 nm; B) 0,210 nm; C) 0,215 nm. Las diferentes secuencias de selectividad (I-VII) que se pueden derivar de estos gráficos se muestran en la tabla IV (columnas A-C). Esta tabla también muestra las secuencias que se predicen cuando el sitio consiste en dos aniones con espaciado muy grande ( $\infty$ ), o cuando el espaciado es cero, esto es, un anión divalente. Se mantienen solamente las secuencias extremas (I y VII o I y III) para todos los valores de  $r_s$ . Entonces, la secuencia de selectividad observada depende de  $r_s$  y de D.

Tabla V

Predicción de las secuencias de selectividad para la unión de cationes divalentes a grupos aniónicos.

(A)  $D=0,110$  nm (B)  $D=0,210$  nm (C)  $D=2,150$  nm (D)  $D \rightarrow \infty, 0$  nm

## Grupo IIA

(I)	Mg>Ca>Sr>Ba	Mg>Ca>Sr>Ba	Mg>Ca>Sr>Ba	Mg>Ca>Sr>Ba
(II)	Mg>Ca>Ba>Sr	Ca>Mg>Sr>Ba	Ca>Mg>Sr>Ba	Mg>Ca>Ba>Sr
(III)	Ca>Mg>Ba>Sr	Ca>Sr>Mg>Ba	Ca>Sr>Mg>Ba	Ca>Mg>Ba>Sr
(IV)	Ca>Ba>Mg>Sr	Ca>Sr>Ba>Mg	Sr>Ca>Mg>Ba	Ca>Ba>Mg>Sr
(V)	Ba>Ca>Mg>Sr	Ca>Ba>Sr>Mg	Sr>Ca>Ba>Mg	Ba>Ca>Mg>Sr
(VI)	Ba>Ca>Sr>Mg	Ba>Ca>Sr>Mg	Sr>Ba>Ca>Mg	Ba>Ca>Sr>Mg
(VII)	Ba>Sr>Ca>Mg	Ba>Sr>Ca>Mg	Ba>Sr>Ca>Mg	Ba>Sr>Ca>Mg

## Grupo IIA'

(I)	Zn>Cd>Hg	Zn>Cd>Hg	Zn>Cd>Hg	Zn>Cd>Hg
(II)	Cd>Zn>Hg	Cd>Zn>Hg	Cd>Zn>Hg	Cd>Zn>Hg
(III)	Cd>Hg>Zn	Cd>Hg>Zn	Cd>Hg>Zn	Cd>Hg>Zn

Esta tabla muestra las secuencias de selectividad que se predicen para la unión de cationes divalentes a dos centros hipotéticos de carga negativa, con un espaciado tal que acomoda cationes con diámetros  $< D$ . Las secuencias (A-C) corresponden a las isotermas (A-C) que se muestran en las figuras 19 y 20. El valor de  $r_s$  aumenta en el sentido de las secuencias (I) a (VII) o de (I) a (III).

Una inspección de esta tabla también revela que no se obtiene la secuencia experimental,  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , cuando el sitio de unión consiste en un anión monovalente o divalente (columna D).

Tabla VI  
Radios iónicos y energías libres de hidratación.

Catión divalente, $X^{2+}$	Radio iónico, $r_i$ (Å)	Energía de hidratación (kcal/mol)
Mg <sup>2+</sup>	0,66	- 669,6
Ni <sup>2+</sup>	0,69	- 720,0
Cu <sup>2+</sup>	0,72	- 705,0
Co <sup>2+</sup>	0,72	- 710,0
Zn <sup>2+</sup>	0,74	- 690,0
Fe <sup>2+</sup>	0,74	- 680,0
Mn <sup>2+</sup>	0,80	- 640,0
Cd <sup>2+</sup>	0,97	- 630,0
Ca <sup>2+</sup>	1,00	- 586,7
Sr <sup>2+</sup>	1,13	- 556,0
Hg <sup>2+</sup>	1,15	- 650,0
Pb <sup>2+</sup>	1,32	- 588,0
Ba <sup>2+</sup>	1,34	- 514,0

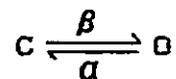
Esta tabla muestra los valores usados para el radio iónico de los cationes divalentes en solución (Pauling, 1967; Marcus, 1983) y las energías libres de hidratación experimentales (Marcus y Kertes, 1969; Nachsen, 1984).

## Apéndice B

Derivación de la ecuaciones (1), (5) y (6):

- ecuación (1).

Consideraremos los dos estados de conductancia del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ , abierto (O) y cerrado (C):



en que  $\alpha$  y  $\beta$  representan las constantes cinéticas que conectan ambos estados del canal. Se define como  $P_o(t)$  la probabilidad de encontrar el canal abierto después de un intervalo de tiempo  $t$ , dado que el canal estaba cerrado a  $t = 0$ .  $P_o(t)$  está relacionada con  $\alpha$  y  $\beta$  mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$dP_o(t)/dt = -\alpha P_o(t) + \beta (1 - P_o(t)). \quad (1)$$

Después de un tiempo largo  $P_o(t)$  alcanza un valor constante ( $dP_o/dt = 0$ ) que llamaremos  $P_o$  (probabilidad de encontrar un canal en el estado abierto en el estado estacionario), luego:

$$P_o = \beta / (\alpha + \beta). \quad (2)$$

Se define  $\beta/\alpha$  como la constante de equilibrio de la reacción (K). Esta constante depende del voltaje a través de la membrana según una distribución de Boltzmann:

$$K = \beta/\alpha = \exp\{-\Delta G^*(V)/RT\} \quad (3)$$

en que  $\Delta G^*(V)$  es la diferencia en energía libre entre ambos estados. Además:

$$\Delta G^*(V) = Fn(V-V_o) \quad , \quad (4)$$

en que F, es la constante de Faraday, n es el número de cargas eléctricas ("gating particles") que se mueven durante la transición abierto/cerrado y  $V_o$  es el potencial eléctrico en que  $\beta/\alpha = 1$ , entonces :

$$\beta/\alpha = \exp\{-nF(V-V_o)/RT\} \quad (5)$$

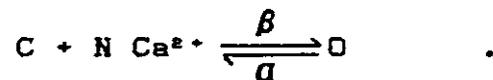
$$P_o = \beta / (\alpha + \beta) = \{1 + \exp\{-nF(V-V_o)/RT\}\}^{-1} \quad (6)$$

Esta ecuación se puede linearizar (para determinar n y  $V_o$ ):

$$\ln((1 - P_o)/P_o) = -(F/RT)nV + nFV_o \quad (F/RT). \quad (7)$$

- ecuación (3): determinación del número de  $\text{Ca}^{2+}$  que son necesarios para abrir el canal.

Consideremos un modelo en que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  entran simultáneamente :



La probabilidad de apertura en estado estacionario (según (2)):

$$P_o = \beta[\text{Ca}]^N / (\alpha + \beta[\text{Ca}]^N) \quad (8)$$

de donde la constante de equilibrio, según (3), es:

$$K = \beta/\alpha \quad (9)$$

ordenando :

$$(1 - P_o)/P_o = (K [\text{Ca}]^N)^{-1} \quad (10)$$

$$P_o / (1 - P_o) = K [\text{Ca}]^N \quad (11)$$

linealizando :

$$\log (P_o / (1 - P_o)) = \log K + N \log [Ca] \quad (12)$$

en que N es el número de calcios que participan en la reacción de abertura del canal o número de Hill,  $N_H$ .

- ecuación (6).

Esta expresión se puede derivar a partir de la ecuación 11 (suponiendo el mismo modelo para la unión de calcio), al definir la constante de disociación aparente, para la unión de calcio, como:

$$K_D = 1/K.$$

Reemplazando, en la ecuación 11:

$$P_o = 1 / (K_D [Ca]^{-N} + 1),$$

y,

$$P_o = (K_D + [Ca]^N) / [Ca]^N \quad (13)$$

## REFERENCIAS

- Adams, P.R., Constanti, A., Brown, D.A., Clark, R.B. 1982. Intracellular  $Ca^{2+}$  activates a fast voltage-sensitive  $K^+$  current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature*, 296 : 746-749.
- Alvarez-Leefmans, F., Rink, T. y Tsien, R. 1981. Free calcium ions in neurones of *Helix aspersa* measured with ion selective microelectrodes. *J. Physiol.* 315 : 531-548.
- Alvarez, O. y Latorre, R. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys. J.* 21 : 1-17.
- Alvarez, O., Latorre, R. y Benos, D. 1985. The study of ion channels in planar lipid bilayers membranes. *J. Electrophys. Tech.* 12: 159-178.
- Barret, J.N., Magleby, K.L., Pallota, B.S. 1982. Properties of single  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.*, 331: 211-230.
- Blinks, J.R., Wier, W., Hess, P., Prendergast, F. 1982. Measurement of  $[Ca]$  in living cells. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 40:1-114.
- Brinley, F.J., Tiffert, T., Scarpa, A., y Mullins, L. 1977. Intracellular calcium buffering capacity in isolated squid axons. *J. Gen. Physiol.* 70: 355-384.
- Carafoli, E. y Penniston, J. 1985. The Calcium Signal. *Sci. Am.* Noviembre.
- Cecchi, X., Alvarez, O., Wolff, D., 1986. Characterization of a calcium activated potassium channel from rabbit intestinal smooth muscle incorporated into planar bilayers. *J. Membrane Biol.* 91 : 11 - 18
- Chrisman, B.L. y Tumolillo, T.A., 1969. Computer analysis of Moessbauer Spectra. En Technical Report 178, Nat. Sci. Fund. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Cook, D.L., Ikeuchi, M., Fujimoto, W.Y., 1984. Lowering of pH inhibits  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 311: 269-271.
- Conway, B.E., 1952. Electrochemical data. p. 132.
- Conway, B.E., 1981. Ionic hydration in Chemistry and Biophysics. Elsevier Sci. Pub.
- Diamond, J. y Wright, E. 1969. Biological Membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Ann. Rev. Physiol.* 31: 581 - 649.

- Ehrenstein, G., Blumenthal, R., Latorre, R., Lecar, H. (1974). Kinetics of the opening and closing of individual excitability-inducing material channels in a lipid bilayer. *J. Gen. Physiol.* 63 : 707-721.
- Einspahr, H., Bugg, C.E., 1977. Crystal structures of calcium complexes of amino acids, peptides and related models. En: *Proceedings of the International Symposium on Calcium binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease*, June 5-9, 1977. Ed. R.H. Wasserman et al.. North-Holland, N.Y.
- Eisenman, G. 1962. Cation Selective Glass Electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* 2, (Parte 2, suplemento): 259 - 323.
- Eisenman, G. 1963. The physical basis for the ionic specificity of the Glass electrode. En: *Glass electrodes for hydrogen and other cations*. Ed. Eisenman, G. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Eisenman, G. y Krasne, S. 1975. The ion selectivity of carrier molecules, membranes and enzymes. *MTP International Review of Science. Biochemistry Series.* C.F. Fox, ed. 2: 27 - 59.
- Erdoş, J. y Maguire, M. 1983. Hormone-sensitive magnesium transport in murine S49 lymphoma cells. *J. Physiol.* 337: 351 -71.
- Fuchs, F. 1971. Ion Exchange Properties of the Calcium Receptor Site of Troponin. *Biochem. Biophys. Acta* 245: 221-229.
- Gardos, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 30: 653-654.
- Golowash, J., Kirkwood, A., Miller, C. 1986. Allosteric Effects of  $Mg^{2+}$  on the Gating of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels from Mammalian Skeletal Muscle. *J. Exp. Biol.* 124 : 5 - 13.
- Gorman, L.F., Herman, A. 1979. Internal effects of divalent cations on potassium permeability in molluscan neurones. *J. Physiol.* 296: 393-410.
- Gorman, L.F., Herman, A., y Thomas, V. 1981. Intracellular calcium and the control of the pacemaker activity. *Federation Proc.* 40: 2233 - 2239.
- Grygorczyk, R. y Schwarz, W. 1983. Properties of the  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  conductance of human red cells as revealed by the Patch-clamp technique. *Cell Calcium* 4: 499-510.

- Heinz, A. y Passov, H. 1980. Role of External Potassium in the Calcium-Induced Potassium Efflux from Human Red Blood Cell Ghosts. *J. Membrane Biol.* 57: 119-131.
- Hidalgo, C., Donoso, P., Liberona, J., Parra, G., Riquelme, G. y Jaimovich, E. 1985. Properties of transverse tubule membranes isolated from frog muscle. *Biophys. J.* 47: 58a.
- Klee, C., Crouch, T. y Richman, P. 1980. Calmodulin. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 489 - 515.
- Kretsinger, R. y Nockolds, C. 1973. Carp muscle calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 248: 3313.
- Latorre, R., Vergara, C., Hidalgo, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 805-809.
- Latorre, R. 1986. The large Calcium-Activated Potassium Channel. En: *Ion Channel Reconstitution*. Editado por: Miller, C. Plenum Press, NY. 431 - 467.
- Leavis, P., Gergely, J. 1984. Thin filament Proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *Critical Review in Biochemistry*. 16 (3): 235 - 305.
- Levitzki, A. 1978. Quantitative Aspects of Allosteric Mechanisms. En *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, N° 28. Editores: Kleinzeller, A., Springer, G., Wittmann, H. Springer-Verlag.
- Lux, H.D., Neher, E., Marty, A. 1981. Single channel activity associated with the  $Ca^{2+}$ -dependent current in *Helix pomatia*. *Pfluegers Arch.*, 389: 293-295.
- Magleby, K.L., Pallota, B.S. 1983.  $Ca^{2+}$  dependence of open and shut intervals distributions from  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* 344: 585-604.
- Marcus, Y., y Kertes, A. 1969. Ion Exchange and Solvent Extraction of Metal Complexes. Wiley-Interscience, London. 13.
- Marcus, Y. 1983. Ionic Radii in Aqueous Solutions. *J. Solut. Chem.* 12 (4): 271-275.
- Martell, A.E., Smith, R.M. 1974. *Critical Stability Constants*. Volumen 1. Plenum Press, N.Y.
- Marty, A. 1981.  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$ -channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, 291: 497-500.

- McManus, O. B., Magleby, K. L. 1985. Kinetic properties of single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ -channels activated by strontium ions. *Biophys. J.* 45: 306a.
- Meech, R. W. 1978. Calcium-Dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 7: 1-18.
- Meech, R. W. 1980.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  conductances in molluscan nerve cells. En: *Molluscan Nerve Cells: From biophysics to behavior*. Editado por J. Koester y J. Bryne, pp. 93-103. Cold Spring Harbor, NY.
- Methfessel, C., Boehm, G. 1982. The gating of single calcium-dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanism. *Biophys. Struct. Mech.* 9: 35-60.
- Moczydlowski, E., Latorre R. 1983a. Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ -channels from rat skeletal muscle incorporated into planar lipid bilayers: evidence for two voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  binding reactions. *J. Gen. Physiol.*, 82: 511-542.
- Moczydlowski, E., Latorre, R. 1983b. Saxitoxin and ouabain binding activity of isolated skeletal muscle membranes as indicators of surface origin and purity. *Biochem. Biophys. Acta.* 732: 412-420.
- Moczydlowski, E., Alvarez, O., Vergara, C., Latorre, R. 1985. Effect of Phospholipid Surface Charge on the Conductance and Gating of a  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^+$  Channel in Planar Lipid Bilayers. *J. Membrane Biol.* 83: 273-282.
- Mueller, P., Rudin, D. O. Tien, H. T. y Wescott, W. 1963. Method for the formation of single bimolecular membranes in aqueous solutions. *J. Physiol.* 277: 153-176.
- Nachsen, D. 1984. Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels. *J. Gen. Physiol.* 83: 941 - 967.
- Ohno, S., Yasufumi, E., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., Suzuki, K. 1984. Evolutionary origin of a calcium dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and calcium-binding protein?. *Nature*, 312: 566-570.
- Pauling, L. 1967. *The Chemical Bond*. Cornell University Press, N. Y.
- Petersen, O. H., Maruyama, Y. 1984. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307: 693-696.

- Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C., Ikemoto, N. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256: 8140-8148.
- Simon, W. y Morf, E. 1973. Alkali cation specificity of carrier antibiotics and their behavior in bulk membranes. En: *Membranes*. Vol. 2. Ed. G. Eisenman. Marcel Dekker. N.Y.
- Singer, S. y Nicholson, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Singer, J. y Walsh, J. 1984. Large conductance calcium activated potassium channels in smooth muscle cell membranes. Reduction in unitary currents due to internal Na ions. *Biophys. J.* 45: 68 - 70.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. 1976. Concentration of MgATP<sup>2-</sup> and Other Ions in Solution: Calculation of the true concentration of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159: 1-5.
- Truesdell, A.H., Christ, C.L., 1967. Glass electrodes for calcium and other divalent cations. En: *Glass electrodes for hydrogen and other cations*, pp. 293-319. Editado por G. Eisenman. Marcel Dekker, NY.
- Tufty, R. y Kretsinger, R. 1975. Troponin and Parvalbumin calcium binding regions predicted in myosin light chain and T4 lysosyme. *Science* 187: 167 - 69.
- Vergara, C., Latorre, R. 1983. Kinetics of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels from rabbit skeletal muscle incorporated into planar lipid bilayers: Evidence for a Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> blockade. *J. Gen. Physiol.*, 82: 543-568.
- Vergara, C. 1983. Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from skeletal muscle membranes in artificial bilayers. Ph.D. Tesis. Universidad de Harvard. Cambridge, Massachusetts.
- Villarroel, A. 1986. Caracterización de las vías de acceso del canal de potasio activado por calcio de músculo esquelético de rata. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Williams, R., Boyer, D., Lardy, H., Myrback, K. 1959. *The Enzymes*. Vol. I. Academic Press. Capitulo 9.
- Williams, R. 1978. Calcium chemistry and its relation to protein binding. En: *Calcium binding proteins and calcium function*. Wasseramn Ed. North-Holland. NY.
- Wong, S. y Lecar, H. 1982. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Biophys. J.* 39: 313-317.

- Woodhull, A.M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61: 687-708.
- Yellen, G. 1984. Ionic permeation and blockade in calcium-activated channel of Chromaffin cells. Thesis. Yale University. New Haven, Connecticut.