

UCHA-FC

DOC-B

D542

C.2

**PAPEL DEL SEGMENTO TRANSMEMBRANAL S4  
EN LA DEPENDENCIA DEL POTENCIAL  
DEL CANAL DE K<sup>+</sup> ACTIVADO POR CALCIO, *hSlo*.**

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

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Láin Felipe Díaz Cuevas

Santiago, Junio de 1998.

Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre de la Cruz.  
Co-Director de Tesis: Dra. Ligia Toro

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

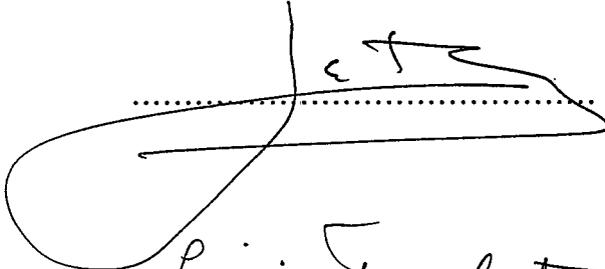
Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

LAÍN FELIPE DÍAZ CUEVAS

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

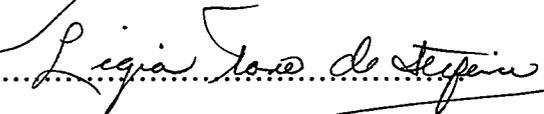
Director de Tesis

Dr. Ramón Latorre



Co-Director de Tesis

Dra. Ligia Toro

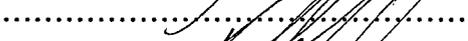


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Osvaldo Alvarez



Dr. Ricardo Bull



Dr. Juan Carlos Sáez



Dr. Francisco Sepúlveda



*PARA FERNÁN Y LÍA , MIS BELLOS PADRES,*

*PARA TODOS MIS QUERIDOS HERMANOS:*

*PAZ*

*TERESA*

*XIMENA*

*RODRIGO*

*ÁLVARO*

*ISABEL*

*PILAR*

*SOLEDAD*

*GONZALO*

*ÍNIGO*

*FERNÁN*

*PARA ENRIQUETTA Y FRIDA*

## AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar aquí un agradecimiento que refleje realmente lo que quisiera comunicar. Sin embargo creo que en varios casos esa gratitud se ha manifestado en forma más o menos cotidiana, cuando los “colegas” se han transformado en amigos.

Ramón le agradezco su paciencia y humildad para enseñarme y aprender de igual a igual, pero más que eso, le agradezco profundamente haberme enseñado a buscar la alegría en mi trabajo.

Quiero agradecer especialmente al maestro Osvaldo, por su infinita paciencia para contestar todas las preguntas y, claro, también por su amistad.

Claudia, compañera, gracias por todo tu amor, por tu cariño y por tu fuerza; ellos han sido vitales día a día. Gracias por compartir tu vida conmigo.

La ayuda de dos personas fue vital en mi aprendizaje en este laboratorio: la de Ricardo, en el mundo de los registros, y la de Cecilia Rojas, en el de la biología molecular.

Quiero agradecerle y recordarle a Pedro Labarca la gran habilidad que mostró para reclutarme en la electrofisiología. Fue el comienzo de todo esto.

Y eso me recuerda a Patty, con quien no llegué a este laboratorio. Gracias por seguir conmigo.

Quiero agradecer en forma especial a Ligia Toro y a Enrico Stefani, quienes más de una vez me aceptaron y enseñaron en sus laboratorios. Vayan a través de ellos mis agradecimientos a Francesca, Martin, Ricardo, Michela y Meera.

En el nombre de Arturo y Daniela, quiero simbolizar un profundo agradecimiento a todos los amigos que me han querido, acompañado y soportado durante de esta larga historia.

Gracias a todos los compañeros y compañeras que hicieron del laboratorio un lugar más cálido: Bernardo, Diego, Gonzalo, Nataniel, Luisa, Orlando, Carlos, Rodolfo, Don Julio, Magdalena, Don Pato, Oliver, Marcelo.

Gracias también Eddie, Casilda, Cecilia y Juan, Andrés y Daniel.

Quiero agradecer especialmente a los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, los profesores Pancho, Ricardo y Juan Carlos.

El financiamiento de mi persona y de parte de mi investigación se debe al Centro de Estudios Científicos de Santiago (CECS), a CONICYT (Beca Doctoral) a FONDECYT (Proyectos 2950028 y 4960005) y al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile (Proyecto G45).

## INDICE DE MATERIAS

<i>LISTA DE TABLAS</i> .....	<i>xi</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	<i>xii</i>
<i>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</i> .....	<i>xv</i>
<i>RESUMEN</i> .....	<i>xvii</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>xx</i>
 <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	 <i>1</i>
 1. <i>ANTECEDENTES GENERALES</i> . .....	 <i>1</i>
 2. <i>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CANALES DE <math>K^+</math> ACTIVADOS POR CALCIO</i> .....	 <i>3</i>
2.1 <i>Corrientes de <math>K^+</math> activadas por <math>Ca^{2+}</math></i> .....	<i>3</i>
2.2 <i>Canales de <math>K^+</math> activados por <math>Ca^{2+}</math></i> .....	<i>3</i>
2.3 <i>Localización y funciones de los canales de <math>K^+</math> activados por <math>Ca^{2+}</math></i> .....	<i>4</i>
 3. <i>CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LOS CANALES DE <math>K^+</math> ACTIVADOS POR <math>Ca^{2+}</math></i> .....	 <i>7</i>
3.1 <i>Clonamiento del canal <math>K_{Ca}</math> de Drosophila: slowpoke (dSlo)</i> . .....	<i>8</i>
3.2 <i>Similitudes del canal <math>K_{Ca}</math> dSlo con los canales de <math>K^+</math> dependientes del potencial</i> . .....	<i>8</i>
3.3 <i>Características generales de los canales slowpoke</i> .....	<i>11</i>

## Indice de Materias

3.4 Los canales $K_{Ca}$ son tetrámeros. ....	17
3.5 Canales de $K^+$ de baja conductancia, dependientes de $Ca^{2+}$ (SK).....	19
4. CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS CANALES DE $K^+$ ACTIVADOS POR $Ca^{2+}$ . . .	19
4.1 Dependencia del $Ca^{2+}$ de la probabilidad del estado abierto de los canales $K_{Ca}$ . ....	20
4.1.1 Los canales $K_{Ca}$ poseen diversas sensibilidades aparentes al $Ca^{2+}$ . ....	20
4.1.2 El coeficiente de Hill sugiere más de dos sitios de $Ca^{2+}$ en los canales $K_{Ca}$ . ....	22
4.1.3 Modelos cinéticos que explican la dependencia de $Ca^{2+}$ de la activación de los canales $K_{Ca}$ . ....	22
4.2 Dependencia del potencial de la probabilidad del estado abierto de los canales $K_{Ca}$ . ....	23
4.2.1 Modelos que explican la dependencia del potencial de los canales $K_{Ca}$ . ....	24
4.2.1.1 Dependencia intrínseca del potencial. ....	25
4.2.1.2 Activación iónica.....	26
4.3 Inactivación en los canales $K_{Ca}$ . ....	31
4.4 El ion $Ba^{2+}$ bloquea a los canales de $K^+$ induciendo una inhibición que imita a la inactivación.....	32
4.4.1 El ion $Ba^{2+}$ bloquea a los canales $K_{Ca}$ . ....	34
5. OBJETIVOS. ....	36
5.1 Objetivo general. ....	36
5.2 Objetivos específicos.....	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
1. <b>BIOLOGÍA MOLECULAR.....</b>	<b>42</b>
1.1. <b>Bacterias.....</b>	<b>42</b>
1.1.1. <b>Cepas bacterianas. ....</b>	<b>42</b>

## Índice de Materias

1.1.2. Cultivo de bacterias. ....	42
1.1.3. Obtención de bacterias competentes. ....	43
1.1.4. Transformación de bacterias.....	43
1.2. Antibióticos.....	44
1.3. Obtención y purificación de DNA plasmidial.....	44
1.4. Purificación de ácidos nucleicos en general.....	45
1.5. Clones. ....	45
1.5.1. Subclonamiento de hSlo en el vector de mutagénesis pALTER <sup>®</sup> -1.....	47
1.6. Mutagénesis. ....	48
1.6.1. Sistema de mutagénesis Altered Sites <sup>®</sup> . ....	49
1.6.2. Mutagénesis por PCR. ....	50
1.7. Secuenciación del DNA. ....	53
1.8. Transcripción in vitro. ....	53
2. RANAS, OOCITOS Y MICROINYECCIÓN. ....	54
2.1. Ranas. ....	54
2.2. Oocitos. ....	54
2.3. Microinyección. ....	55
2.3.1. Procedimiento de microinyección.....	56
3. ENSAYO DE UNIÓN DE IBERIOTOXINA.....	57
3.1. Medición de la densidad de canales usando iberiotoxina.....	57
3.2. Conteo de la toxina radioactiva, [ <sup>125</sup> I]-IbTX-D19Y/Y36F.....	59
4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS. ....	59
4.1. Pipetas de registro. ....	60
4.2. Soluciones de registro. ....	61
4.3. Sistema de registro de las corrientes macroscópicas. ....	62
4.4. Procedimiento de registro de las corrientes macroscópicas. ....	64
4.5. Resistencia en serie. ....	65

5. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	66
5.1. Estimación del bloqueo por $Ba^{2+}$ .....	67
5.2. Estimación del número equivalente de cargas de compuerta ( $z_{eq}$ ).....	68
6. REACTIVOS ESPECÍFICOS.....	70
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
1. LOS CANALES hSLO SILVESTRES EXPRESADOS EN OOCITOS, SON SENSIBLES AL $Ca^{2+}$ Y DEPENDIENTES DEL POTENCIAL. ....	71
2. LAS CORRIENTES hSLO POSEEN UN PROCESO DE INHIBICIÓN LENTO EN PARCHES ESCINDIDOS. ....	73
2.1. El $Ba^{2+}$ interno induce un proceso de inhibición similar a aquel observado al escindir el parche de membrana.....	76
2.2. Propiedades del bloqueo de las corrientes hSlo inducido por el $Ba^{2+}$ interno. Estimación de la concentración de $Ba^{2+}$ contaminante.....	79
2.2.1. El éter corona quelante de $Ba^{2+}$ , A18C6T, inhibe el decaimiento de la corriente observado sin $Ba^{2+}$ agregado. ....	84
2.2.2. El quelante de $Ba^{2+}$ aumenta la duración de los períodos activos de los canales hSlo. ....	88
2.3. El éter corona A18C6T remueve el bloqueo inducido por $Ba^{2+}$ .....	89
3. PROPIEDADES DE LA ACTIVACIÓN DE LOS CANALES hSLO EXPRESADOS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS. ....	91
3.1. Mutaciones puntuales del segmento S4.....	99
3.2. Efectos de las mutaciones del segmento S4: desplazamiento de las curvas de activación en el eje del potencial. ....	101
3.3. Efectos de las mutaciones del segmento S4: modificación del número de cargas de compuerta.....	105

3.4. Interpretación cuantitativa de los resultados sobre la base de un modelo simple. ....	109
3.4.1. Características del modelo de activación: casos particulares. ....	113
3.4.2. Las modificaciones de la activación de hSlo inducidas por las mutaciones del segmento S4, pueden ser explicadas por cambios en $\Delta G_0$ y z. ....	117
3.5. Mutaciones dobles y triples del segmento S4: expresión funcional y características electrofisiológicas de los mutantes. ....	119
3.5.1. Mutaciones del segmento S4 que reducen o suprimen la expresión de hSlo. ...	123
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>128</b>
1. LOS CANALES hSLO EXPRESADOS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS CONSERVAN LOS RASGOS TÍPICOS DE LOS CANALES $K_{Ca}$ .....	129
2. EL $Ba^{2+}$ CONTAMINANTE CAUSA LA INHIBICIÓN DE LA CORRIENTE OBSERVADA CON POTENCIALES DESPOLARIZANTES. ....	130
2.1. Características del bloqueo por $Ba^{2+}$ de los canales hSlo. ....	134
3. RASGOS ESTRUCTURALES Y ACTIVACIÓN DE LOS CANALES $K_{Ca}$ .....	138
4. RESIDUOS INVOLUCRADOS EN LA DETECCIÓN DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL EN hSLO.....	140
5. LIMITACIONES DE LAS MEDIDAS DE $Z_{EQ}$ .....	146
6. LAS MUTACIONES QUE SUPRIMEN LA EXPRESIÓN DE LAS CORRIENTES hSLO PLANTEAN INTERACCIONES POSIBLES ENTRE LOS RESIDUOS CARGADOS DE LOS SEGMENTOS S2, S3 Y S4.....	148
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>155</b>

<b>APÉNDICES .....</b>	<b>170</b>
<b>I. CÁLCULO DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN DEL COMPLEJO <math>BA^{2+}</math>-A18C6T. ....</b>	<b>170</b>
<b>II. PENDIENTE LÍMITE.....</b>	<b>174</b>
<b>III. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE IBTX POR <math>NA^{+}</math> .....</b>	<b>178</b>

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Número de cargas de compuerta de *hSlo* silvestre y de los mutantes del segmento S4 ..... 108

**Tabla 2.** Valores de  $V_{1/2}$  a las  $[Ca^{2+}]$  indicadas, para *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4..... 109

**Tabla 3.** Parámetros de ajuste del modelo de activación a las curvas de  $V_{1/2}$  en función de la  $[Ca^{2+}]$ , para *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4..... 120

LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de la conformación putativa en la membrana del canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , *hSlo*, y del canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker*. .....12

**Figura 2.** Alineamiento de las regiones S2, S3 y S4 de los canales *hSlo* y *dSlo* con canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial. ....15

**Figura 3.** Efectos del  $Ca^{2+}$  y del potencial en la actividad del canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , de músculo esquelético de rata. ....21

**Figura 4.** Modelo de activación de un canal  $K_{Ca}$ , con dependencia intrínseca del potencial.....26

**Figura 5.** Modelo de *activación iónica* de un canal  $K_{Ca}$ .....29

**Figura 6.** El segmento S4 está conservado en canales activados por nucleótidos cíclicos y en un canal rectificador de entrada.....39

**Figura 7.** Mapa del vector de alta expresión Z-M4.....47

**Figura 8.** Subclonamiento de *hSlo* en el fagémido pAlter-1.....49

**Figura 9.** Esquema del procedimiento de mutagénesis *in vitro* “*Altered sites*” .....51

**Figura 10.** Procedimiento de mutagénesis por PCR.....52

**Figura 11.** Esquema del sistema de registro y adquisición de corriente. ....63

**Figura 12.** Estructura química del éter corona A18C6T.....70

**Figura 13.** Dependencia del voltaje y del  $Ca^{2+}$  de las corrientes *hSlo* expresadas en oocitos de *Xenopus laevis*. ....72

**Figura 14.** Las corrientes macroscópicas *hSlo* presentan una inhibición lenta dependiente del potencial.....74

**Figura 15.** El  $Ba^{2+}$  interno induce una inhibición de las corrientes *hSlo* que es cualitativamente similar a la inhibición observada sin  $Ba^{2+}$  agregado.....77

<b>Figura 16.</b> Efecto del $Ba^{2+}$ interno en la cinética de entrada al estado bloqueado. ....	80
<b>Figura 17.</b> El tiempo de recuperación desde el estado bloqueado, $\tau_r$ , es independiente de la $[Ba^{2+}]$ . ....	81
<b>Figura 18.</b> Dependencia del $Ba^{2+}$ de las velocidades de entrada y salida del bloqueo. ....	82
<b>Figura 19.</b> Dependencia del potencial de las constantes de velocidad de entrada al estado bloqueado ( $\alpha$ ) y de salida del mismo ( $\beta$ ).....	85
<b>Figura 20.</b> El quelante de $Ba^{2+}$ , A18C6T, remueve la inhibición de la corriente.....	87
<b>Figura 21.</b> El quelante de $Ba^{2+}$ , A18C6T, decrece la frecuencia de los estados cerrados de larga duración. ....	88
<b>Figura 22.</b> El quelante de $Ba^{2+}$ , A18C6T, decrece la velocidad de bloqueo, $\alpha$ . ....	90
<b>Figura 23.</b> Corrientes <i>hSlo</i> típicas expresadas en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	93
<b>Figura 24.</b> Curvas de probabilidad del estado abierto ( $P_o$ ) normalizadas por la probabilidad máxima. ....	95
<b>Figura 25.</b> Dependencia del $Ca^{2+}$ del $V_{1/2}$ . ....	97
<b>Figura 26.</b> Las corrientes <i>hSlo</i> son independientes del $Ca^{2+}$ cuando la $[Ca^{2+}]$ es menor que 100 nM. ....	98
<b>Figura 27.</b> Alineamiento del segmento S4 de <i>hSlo</i> y del canal de $K^+$ dependiente del potencial, <i>Shaker</i> . ....	100
<b>Figura 28.</b> Registros de corrientes de los mutantes del segmento S4 que afectan la activación de <i>hSlo</i> . ....	102
<b>Figura 29.</b> Registros de corriente de los mutantes del segmento S4 que inducen efectos menores en la activación de <i>hSlo</i> . ....	104
<b>Figura 30.</b> Curvas de probabilidad normalizada del estado abierto ( $P_o$ ) en función del potencial para <i>hSlo</i> silvestre y mutantes del segmento S4. ....	105
<b>Figura 31.</b> Curvas de probabilidad normalizada del estado abierto en función del potencial (curvas $P_o$ -V) para <i>hSlo</i> silvestre y mutantes del segmento S4. ....	106

<b>Figura 32.</b> Características del modelo propuesto para la activación de <i>hSlo</i> .....	116
<b>Figura 33.</b> Dependencia del $\text{Ca}^{2+}$ del potencial de activación media, $V_{1/2}$ , para <i>hSlo</i> silvestre y los mutantes del segmento S4.....	118
<b>Figura 34.</b> Características electrofisiológicas del mutante doble R207Q-R213Q.....	122
<b>Figura 35.</b> La supresión de corrientes iónicas inducida por las mutaciones del segmento S4 de <i>hSlo</i> se correlaciona con una ausencia de sitios de unión para la iberiotoxina. ....	126
<b>Figura 36.</b> Esquema de la distancia eléctrica y del perfil de energía del sitio de unión de $\text{Ba}^{2+}$ .....	136
<b>Figura 37.</b> El segmento S4 como parte del sensor de potencial: un modelo altamente especulativo. ....	142
<b>Figura 38.</b> Movimiento del segmento S4 durante la activación del canal <i>Shaker</i> . ...	144
<b>Figura 39.</b> Interacciones electrostáticas putativas de los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 de <i>hSlo</i> .....	151

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Å	Amstrong, $10^{-10}$ metros
BSA	Seroalbumina de Bovino
$\delta$	Distancia eléctrica
G	Conductancia
$G_{max}$	Conductancia máxima
HEDTA	Acido N-(2-Hidroxietil)etilendiaminotetraacético
<i>hSlo</i>	Canal $K_{Ca}$ clonado del miometrio humano
IbTX	Iberiotoxina
$I_{EE}$	Corriente en estado estacionario
$K_{Ca}$	Canal de $K^+$ de gran conductancia, dependiente de $Ca^{2+}$
$K_v$	Canal de $K^+$ dependiente del potencial
$\mu m$	Micrómetro, $10^{-6}$ metros
$\mu M$	Micromolar, $10^{-6}$ molar
mM	Milimolar, $10^{-3}$ molar
MES	Metanotsulfonato
$M\Omega$	Mega Ohm, $10^6$ Ohm
mV	Milivolts, $10^{-3}$ volts

$P_o$	Probabilidad normalizada del estado abierto
$Q$	Carga de compuerta
$V$	Volts
$V_{1/2}$	Potencial al cual $G = 0,5 \cdot G_{\max}$
$s$	Segundos
$T$	Temperatura en grados Kelvin
$Z_{eq}$	Carga equivalente aparente

## RESUMEN

La activación de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) es modulada por el potencial eléctrico y por el  $Ca^{2+}$  intracelular. La conductancia macroscópica de una población de canales  $K_{Ca}$  aumenta cuando la membrana se despolariza o cuando la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]$ ) se incrementa.

El origen molecular de la dependencia de potencial de los canales  $K_{Ca}$  no ha sido claramente elucidado, pero se puede explicar con el movimiento de un "sensor" de potencial intrínseco en el campo eléctrico transmembranal. El sensor es un dominio cargado o dipolar de la proteína que está acoplado al mecanismo de apertura y cierre (*compuerta*) de la vía de conducción del canal. Cuando la membrana se despolariza, el sensor de potencial se reubica en el campo e induce un cambio en la conformación de la compuerta. Este cambio permite a su vez el paso de los iones a través de la vía de conducción del canal. En los canales de  $Na^+$ , de  $K^+$  y de  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial se ha demostrado que el sensor de potencial está formado en parte por el cuarto segmento transmembranal, denominado S4.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que confieren la dependencia del potencial a un canal  $K_{Ca}$  clonado del miometrio humano (*hSlo*) se realizó mutagénesis dirigida del sensor de potencial putativo: el segmento S4. Si el movimiento de un aminoácido cargado en el campo eléctrico está acoplado a la activación del canal, la neutralización de dicho aminoácido debe inducir una disminución de la dependencia del potencial en el canal mutado.

La dependencia del potencial y del  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales se estimó midiendo corrientes iónicas macroscópicas, utilizando la técnica de potencial controlado (“*patch clamp*”) en macroparches de membrana de oocitos de *Xenopus laevis*. Con este fin, los oocitos se inyectaron previamente con mRNA del canal silvestre (WT) o de cada uno de los canales mutantes.

Los canales *hSlo* WT expresados en oocitos son dependientes del potencial y del  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando los canales se activan con potenciales mayores que 100 mV, las corrientes macroscópicas presentan un proceso de inhibición dependiente del tiempo y del potencial: la corriente crece, alcanza un máximo y luego decae. Este fenómeno fue caracterizado y se concluyó que la inhibición es un proceso de bloqueo inducido por cantidades contaminantes de  $\text{Ba}^{2+}$  presentes en el medio de la cara intracelular del canal.

La dependencia del potencial de *hSlo* se describió ajustando una distribución de Boltzmann a las curvas de conductancia (curvas G-V). Los parámetros de ajuste son el potencial en que se alcanza un 50% de la conductancia máxima ( $V_{1/2}$ ) y el número aparente de cargas de compuerta ( $z_{eq}$ ). La dependencia del potencial de *hSlo* corresponde al movimiento de 1,5 cargas equivalentes a través de todo el campo eléctrico.

En el dominio del  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de *hSlo* puede ser sensible o insensible a la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es mayor que 100 nM, el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  facilita la activación, desplazando las curvas G-V hacia potenciales hiperpolarizados: el  $V_{1/2}$  decrece a medida que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  aumenta. Sin embargo, cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es menor que  $\approx 100$  nM, el  $V_{1/2}$  se hace independiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . En esta condición, los canales pueden ser activados por el potencial sin que cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  alteren el  $V_{1/2}$  de las

## Resumen

curvas G-V. Este resultado implica que *hSlo* debe tener un sensor intrínseco de potencial.

Los efectos de las mutaciones del segmento S4 en la activación de *hSlo*, se explicaron en términos de un modelo cinético de seis estados, caracterizado por el número de cargas de compuerta ( $z$ ), la diferencia de energía libre entre los estados cerrados y abiertos en ausencia de potencial eléctrico ( $\Delta G_0$ ), las constantes de disociación de la unión de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{DA}$  y  $K_{DB}$ ) y la disminución del  $\Delta G_0$  inducida por la unión de uno o dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  ( $A$  y  $B$ ). El análisis de los mutantes indica que sólo dos residuos positivos se mueven en el campo eléctrico: las argininas 210 y 213. El desplazamiento de estos residuos en el campo eléctrico está acoplado a la activación del canal. La neutralización de estos residuos reduce la carga aparente de compuerta en aproximadamente un 50%. La mutación de estos residuos como así también de la arginina 207 modifican el parámetro  $\Delta G_0$ . La mutación de la arginina 201, leucina 204, glutamina 216 y glutamato 219 no afectan la dependencia del potencial de *hSlo* y solo producen cambios menores en  $\Delta G_0$ .

Los resultados permiten concluir que el canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$  *hSlo* posee un sensor de potencial intrínseco, constituido en parte las argininas 210 y 213. Por otro lado, el proceso de inhibición observado con potenciales mayores que 100 mV es un bloqueo por  $\text{Ba}^{2+}$  interno. Se descartó así que *hSlo* posea un proceso de inactivación intrínseca, dependiente de potencial.

## ABSTRACT

Calcium-dependent high-conductance  $K^+$  channel ( $K_{Ca}$ ) gating is modulated by transmembrane voltage and intracellular  $Ca^{2+}$ . The macroscopic conductance of a population of channels increases when the membrane depolarizes and/or the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]$ ) increases.

The molecular nature of  $K_{Ca}$  channel voltage dependence has not been clearly elucidated yet, although it can be explained by the movement of an intrinsic voltage *sensor* in the transmembrane electric field. The sensor is a charged or dipolar protein domain that is coupled to the opening and closing mechanism (*gate*) of conduction pathway of the channel. When the membrane potential depolarizes, the voltage sensor moves inducing a conformational change in the gate. The latter allows ions to cross through the conduction pathway of the channel. In voltage-dependent  $Na^+$ ,  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels it has been demonstrated that the voltage sensor is made, at least in part, by the S4 transmembrane segment.

To study the mechanisms that confer the voltage dependence to a  $K_{Ca}$  channel cloned from human myometrium (*hSlo*) site-directed mutagenesis was performed in the putative voltage sensor: the S4 segment. If the movement of a charged residue in the electric field is coupled to the channel gating, the neutralization of that amino acid should reduce the voltage dependence of the mutant channel.

## Abstract

Voltage and  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the channels were estimated measuring macroscopic currents, with the patch clamp technique, in *Xenopus laevis* oocytes macropatches. With this goal, oocytes were previously injected with the mRNA of the wild type (WT) or mutant channels.

Wild type *hSlo* channels expressed in oocytes are voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. If the channels are activated by voltages greater than 100 mV, the macroscopic currents show a time- and voltage-dependent inhibition process: the current increases up to a maximum and then decays. This phenomenon was characterized concluding that the inhibition process is a blockade induced by contaminant  $\text{Ba}^{2+}$  that exists in the intracellular medium of the channel.

Voltage dependence of *hSlo* was described fitting a Boltzmann distribution to the conductance curves (G-V curves). The fitting parameters are the half activation voltage ( $V_{1/2}$ ) and the apparent number of gating charges ( $z_{eq}$ ). Voltage dependence of *hSlo* agrees with the movement of 1.5 equivalent gating charges through the whole electric field.

In the  $\text{Ca}^{2+}$  domain, *hSlo* gating has two stages. If  $[\text{Ca}^{2+}]$  is greater than 100 nM, a  $[\text{Ca}^{2+}]$  increase facilitates the activation, shifting the G-V curves towards hyperpolarized potentials:  $V_{1/2}$  decreases as  $[\text{Ca}^{2+}]$  increases. However, when  $[\text{Ca}^{2+}]$  is lower than 100 nM,  $V_{1/2}$  is  $[\text{Ca}^{2+}]$ -independent. In this condition channels can be activated by voltage and  $[\text{Ca}^{2+}]$  changes do not alter the  $V_{1/2}$  of G-V curves. This result implies that *hSlo* has an intrinsic voltage sensor.

## *Abstract*

The effects of S4 segment mutations on *hSlo* gating were explained in terms of a six states kinetic model, characterized by the number of gating charges ( $z$ ), the free energy difference between the open and closed states ( $\Delta G_0$ ), the dissociation constants for the binding of two  $\text{Ca}^{2+}$  ions ( $K_{DA}$  y  $K_{DB}$ ) and the  $\Delta G_0$  decrease induced by the binding of one or two  $\text{Ca}^{2+}$  ions ( $A$  and  $B$ ).

The results indicates the movement of just two positive residues in the electric field: arginines 210 and 213. These two residues are coupled to channel gating. The neutralization of these amino acids reduces the apparent gating charge by approximately 50%. Mutation of these residues as well as the arginine 207 modifies  $\Delta G_0$ . The mutation of arginine 201, leucine 204, glutamine 216 and glutamate 219 does not affect the voltage dependence of *hSlo* and induces just minor changes in  $\Delta G_0$ .

The results allow to conclude the  $K_{\text{Ca}}$  *hSlo* channel has an intrinsic voltage sensor, constituted in part by arginines 210 and 213. The inhibition process observed with voltages greater than 100 mV is due to an internal  $\text{Ba}^{2+}$  blockade. Thus, the presence of an intrinsic voltage-dependent inactivation process in *hSlo* was discarded.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Antecedentes Generales.*

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana cuya función es catalizar el tránsito de átomos o moléculas cargadas a través de un medio hidrófobo caracterizado por una constante dieléctrica baja ( $\approx 2$ ; Hille 1992), como son las membranas celulares. Esta función se logra debido a la existencia de un poro acuoso que actúa como vía de conducción para iones, que reduce la energía necesaria para transferir la partícula cargada desde el medio polar (citoplasma, espacio extracelular, etc.) al espacio hidrófobo interno de la membrana (Latorre y Alvarez, 1996). Sin la existencia de estas proteínas, los átomos o moléculas cargadas no podrían entrar ni salir de la célula con la rapidez requerida por procesos electrofisiológicos, tales como el potencial de acción o la transmisión sináptica.

Una de las características más llamativas de los canales iónicos es su capacidad de ser activados por cambios del potencial eléctrico transmembranal (Caterall 1986; Hille 1992; Latorre y col. 1989). Gracias a esta característica fundamental de los canales iónicos es que las neuronas y células musculares poseen la capacidad de generar y conducir señales eléctricas que permiten el funcionamiento del sistema nervioso y motor. Los canales responden además a estímulos tan variados como neurotransmisores, hormonas, lípidos, nucleótidos y iones, y su capacidad de respuesta

puede ser modulada por fosforilación, proteínas G, y subunidades accesorias (Caterall 1986; Hille 1992; Toro 1991).

Otra propiedad fundamental de los canales es la selectividad iónica, es decir la capacidad con que un canal discrimina a los iones que pueden ser conducidos a través de él. Es así que hay canales que conducen específicamente ya sea  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Cl}^-$ . Entre los canales con mayor selectividad se encuentran los canales de  $\text{K}^+$ , que son cerca de cien veces más permeables al  $\text{K}^+$  que al  $\text{Na}^+$  (Hille 1992; Latorre y col. 1989; Latorre 1994). Por otro lado, ciertos canales activados por neurotransmisores o nucleótidos cíclicos como el canal receptor de acetilcolina (RAC) y los canales activados por AMP cíclico (cAMP) y GMP cíclico (cGMP), discriminan muy débilmente entre diferentes cationes. Es así que estos canales pueden conducir a la vez  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Kaupp, 1991; Hille, 1992; Finn y col. 1996).

El canal iónico que será objeto de estudio en esta tesis, es un canal de  $\text{K}^+$  de gran conductancia, activado por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ). Entre los rasgos que definen a este tipo de canales se destacan: i. su gran conductancia, del orden de 100 a 300 pico Siemens (pS, en 100 mM KCl simétrico), asociada a una alta capacidad de seleccionar iones  $\text{K}^+$  en relación a otros cationes, y ii. su sensibilidad al potencial transmembranal y al  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta característica, única de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , permite que estos canales se activen cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aumenta o cuando la membrana se despolariza (Blatz y Magleby 1987; Hille 1992; Latorre y col. 1989; Latorre 1994; McManus 1991).

## 2. Características generales de los canales de $K^+$ activados por calcio.

### 2.1 Corrientes de $K^+$ activadas por $Ca^{2+}$ .

Las primeras observaciones que indicaron que el calcio era capaz de regular la permeabilidad de la membrana al  $K^+$  se hicieron en glóbulos rojos hace cuatro décadas (Gardos, 1958; Meech 1978). Sin embargo, la existencia de una conductancia de potasio directamente dependiente de calcio fue propuesta por primera vez en los años setenta. En esa época se observó que al microinyectar calcio al citoplasma de neuronas de *Aplysia californica* se inducía un descenso de la resistencia de la membrana, que estaba asociado a una hiperpolarización (Meech y Strumwasser, 1970). Esta hiperpolarización podía ser prevenida por tetraetilamonio (TEA) externo y el potencial de inversión de la misma dependía de la concentración de  $K^+$  de la solución externa (Meech, 1972; Meech, 1974). Tomando en cuenta la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  y la capacidad de estabilizar el potencial de membrana de esta conductancia, se propuso que esta corriente de  $K^+$  acoplaría el metabolismo del  $Ca^{2+}$  y el potencial de la membrana al flujo de  $K^+$  y la excitabilidad celular (Meech 1978).

### 2.2 Canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$ .

Fue solamente una década después que se obtuvo evidencias directas de la entidad molecular responsable de esta conductancia: los canales de potasio dependientes de calcio. Estos canales fueron registrados en neuronas de vertebrados

(Adams y col. 1982), en células cromafines de bovino (Marti, 1981), en miotubos de rata (Pallota y col. 1981), en túbulos transversales de músculo esquelético de conejo (Latorre y col. 1982) y en clones celulares derivados de la pituitaria de rata (Wong y col. 1982). Un rasgo notable compartido por estos canales es su alta conductancia al potasio: entre 130 a 300 pS (en KCl 100 mM a 140 mM, simétrico). Esta gran conductancia está asociada a una capacidad exquisita de discriminar cationes en favor del potasio. La razón de permeabilidad al  $\text{Na}^+$  en relación al  $\text{K}^+$ , determinada a partir del potencial biológico, ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} \leq 0.01$ ) indica que a pesar de su gran capacidad de conducción, estos canales no han perdido la capacidad de seleccionar al  $\text{K}^+$ , pues son cerca de cien veces más permeables al  $\text{K}^+$  que al  $\text{Na}^+$  (Blatz y Magleby 1987; Latorre y col. 1989; Latorre 1994). Sin embargo, además de los canales de  $\text{K}^+$  de gran conductancia ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), se describieron canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya conductancia es baja ( $\approx 20$  pS; Lux y col. 1981; Blatz y Magleby 1987). Debido a que estos canales de baja conductancia ( $\leq 50$  pS) poseen una farmacología distinta a la de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , se han agrupado en una clase distinta, denominada "SK" (Blatz y Magleby 1987; Latorre y col. 1989; McMannus 1991).

### 2.3 Localización y funciones de los canales de $\text{K}^+$ activados por $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  se encuentran en una gran variedad de células y tejidos, como por ejemplo, neuronas, músculo liso, músculo estriado, células secretoras, epitelios, fibroblastos y linfocitos entre otros (Blatz y Magleby 1987; Latorre y col. 1989;

McManus 1991; Meech 1978; Toro 1991). La diversidad de los papeles que los canales  $K_{Ca}$  tienen en la fisiología de la célula es muy amplia e imposible de detallar en esta tesis. Con el fin de ilustrar esta diversidad se describirá brevemente algunos sistemas en donde la función de estos canales ha sido elucidada.

En neuronas y músculo de invertebrados, los canales  $K_{Ca}$  están involucrados en la fase rápida de repolarización del potencial de acción (Meech 1978) y por lo tanto son en parte responsables de la forma de las espigas (Adams y col. 1982; Elkins y col. 1986). En neuronas de *Helix*, la entrada de  $Ca^{2+}$  asociada con la fase de ascenso del potencial de acción permite que los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  se activen para inducir la repolarización de la membrana (Crest y Gola 1993; Gola y col. 1990). Adicionalmente, la acumulación residual de  $Ca^{2+}$ , debida al disparo repetitivo de potenciales de acción en estas neuronas, lleva a una activación progresivamente más temprana de la corriente  $K_{Ca}$ , que tiene como resultado una inhibición completa de los potenciales de acción (Crest y Gola 1993).

La segregación subcelular de canales iónicos es esencial en la función de las células excitables (Sheng y Wyszynski, 1997). Un ejemplo notable es la colocalización de canales  $K_{Ca}$  con canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial (CCV) en las zonas activas de liberación de neurotransmisor de los terminales presinápticos de la unión neuromuscular de sapo. Cuando los canales  $K_{Ca}$  son bloqueados con caribdotoxina, se produce un aumento de la liberación de neurotransmisor. La cercanía de los canales  $K_{Ca}$  con los canales CCV es tal que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los últimos permitiría la

activación rápida de los canales  $K_{Ca}$ , modulando así la duración del potencial de acción y por lo tanto, la  $[Ca^{2+}]_i$  en el terminal (Robitaille y col. 1993).

Los canales  $K_{Ca}$  juegan un papel importante en el control de la actividad contráctil del músculo liso de útero. El bloqueo específico de estos canales con iberitoxina (IbTX) induce contracción del músculo uterino humano (Anwer y col. 1993; Toro y col. 1998). Cuando la toxina se aplica a células de miometrio humano en cultivo, se induce una despolarización de la membrana. El cambio en el potencial de membrana produce a su vez una activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de potencial que tiene como resultado un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción del músculo liso (Anwer y col. 1993).

Se ha propuesto que los canales  $K_{Ca}$  presentes en el músculo liso de las arteriolas cerebrales, regularían el tono vascular intrínseco a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Brayden y Nelson 1992; Nelson y col. 1995). Cuando la presión intravascular aumenta, el músculo liso de las arteriolas se despolariza y se contrae como resultado de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de calcio dependientes del potencial (Nelson y col. 1990). La entrada de calcio activa a su vez canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , hiperpolarizando la membrana y relajando el músculo liso arteriolar; los canales  $K_{Ca}$  funcionarían como sensores endógenos del  $Ca^{2+}$  intracelular, formando parte de un ciclo de retroalimentación negativa, con una función vasodilatadora de las arteriolas (Brayden y Nelson 1992). Ultimamente se ha propuesto que el tono vascular intrínseco estaría regulado en forma fina mediante la activación localizada de pequeños grupos de canales  $K_{Ca}$ , inducida por "chispas de calcio" ("*calcium sparks*"; Nelson y col. 1995). Las chispas de calcio consisten en un

incremento espontáneo, transitorio y altamente localizado de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los miocitos de las arteriolas cerebrales. Las chispas se deben a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana del retículo sarcoplásmico sensibles a ryanodina (Fay 1995), y están asociadas a corrientes de salida, transitorias y espontáneas (CSTE; Nelson y col. 1995). Las CSTE dependen directamente de las chispas de  $Ca^{2+}$  y se deben a la apertura de canales  $K_{Ca}$ . Se propuso que la regulación del tono vascular se debería al efecto hiperpolarizante de la apertura de los canales  $K_{Ca}$ , pues tanto el bloqueo de las chispas de  $Ca^{2+}$  con ryanodina como el de las CSTE con iberiotoxina, produce una despolarización de la membrana con la consecuente constricción de las arteriolas (Nelson y col. 1995).

Los canales  $K_{Ca}$  también están involucrados en la fisiología de los receptores olfatorios (Morales y col. 1995). Cuando las neuronas del epitelio olfatorio de la rana son expuestas a odorantes pútridos, las neuronas desarrollan un potencial de receptor hiperpolarizante que inhibe la descarga de potenciales de acción. Esta respuesta se debe a una corriente de  $K^+$  que depende del  $Ca^{2+}$  externo y es inhibida por una concentración nanomolar de caribdotoxina, un bloqueador peptídico de los canales  $K_{Ca}$  (Miller y col. 1985).

### 3. *Características moleculares de los canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$ .*

El clonamiento de los canales de  $K^+$  de gran conductancia dependientes de  $Ca^{2+}$ , abrió sin dudas, una nueva etapa en el estudio detallado de la estructura de estos canales

y permitió establecer correlatos entre la estructura primaria de los diversos dominios con la función que éstos tienen en el canal.

### 3.1 Clonamiento del canal $K_{Ca}$ de *Drosophila*: *slowpoke* (*dSlo*).

El clonamiento del primer canal  $K_{Ca}$  fue facilitado por la existencia de la mutación *slowpoke* (*Slo*) en la especie *Drosophila melanogaster*. Los músculos y neuronas de las larvas y los músculos de los adultos de la mosca *Drosophila* poseen corrientes de salida dependientes del potencial y del calcio (Wu y Ganetzky 1992). Una de éstas es una corriente de  $K^+$  rápida, transitoria y dependiente de  $Ca^{2+}$  ( $I_{CF}$ , Salkoff, 1983). Esta corriente es específicamente eliminada por mutaciones en el locus *Slo* (Atkinson y col. 1991; Elkins y col. 1986; Komatsu y col. 1990; Wu y Ganetzky 1992; Singh y Wu, 1989; Saito y Wu 1991). Estudios genéticos permitieron establecer la localización cromosómica del locus mutado y posteriormente clonar el gen *Slo* (Atkinson y col. 1991).

### 3.2 Similitudes del canal $K_{Ca}$ *dSlo* con los canales de $K^+$ dependientes del potencial.

El clonamiento del canal  $K_{Ca}$  de *Drosophila*, *slowpoke* (*dSlo*), demostró que estos canales son molecularmente distintos de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial ( $K_v$ ), conformando una familia sólo parcialmente relacionada a ellos, pero que sin embargo posee características en común. El DNA clonado de *Drosophila* codifica un

polipéptido de 1183 aminoácidos. El análisis de hidrofobicidad del péptido deducido mostró que en el extremo amino de *dSlo* se encuentran seis segmentos hidrófobos (Atkinson y col. 1991), homólogos a los segmentos presentes en otros canales de  $K^+$  (Jan y Jan 1992). La zona de mayor similitud entre *Slo* y otros canales de  $K^+$  se encontró en el dominio H5 o P, que es un dominio integrante de la vía de conducción de los canales de  $K^+$  (Jan y Jan 1992; Jan y Jan 1994; MacKinnon 1995).

Otra región de *dSlo* con alta similitud a los canales dependientes del potencial es el segmento hidrófobo S4. La secuencia primaria del segmento S4 de los canales de  $K^+$ , de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial, posee un patrón conservado, constituido por cuatro a ocho residuos cargados positivamente (argininas o lisinas), separados entre sí por dos aminoácidos hidrófobos (Catterall 1986; Jan y Jan 1990; Noda y col. 1984; Noda y col. 1986). El dominio S4 de *dSlo* fue acotado a un segmento que contenía seis residuos cargados, cuatro de ellos positivamente, mostrando una conservación parcial respecto a los canales  $K_v$  (Atkinson y col. 1991). Desde el clonamiento de los primeros canales iónicos dependientes del potencial, se propuso que debido a la naturaleza cargada del segmento S4 este dominio podría ser parte del sensor de potencial de estos canales (Noda y col. 1984, Noda y col. 1986). Esta hipótesis fue verificada para los canales de  $Na^+$  (Stühmer y col. 1989), y posteriormente para los canales de  $K^+$  (Papazian y col. 1991) y de  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial (García y col. 1996).

La secuencia génica clonada por Atkinson y col. (1991) no contenía un codón iniciador y por lo tanto no pudo ser expresada funcionalmente. Sin embargo, tomando en cuenta que las mutaciones del locus *slo* eliminaban selectiva y completamente la corriente

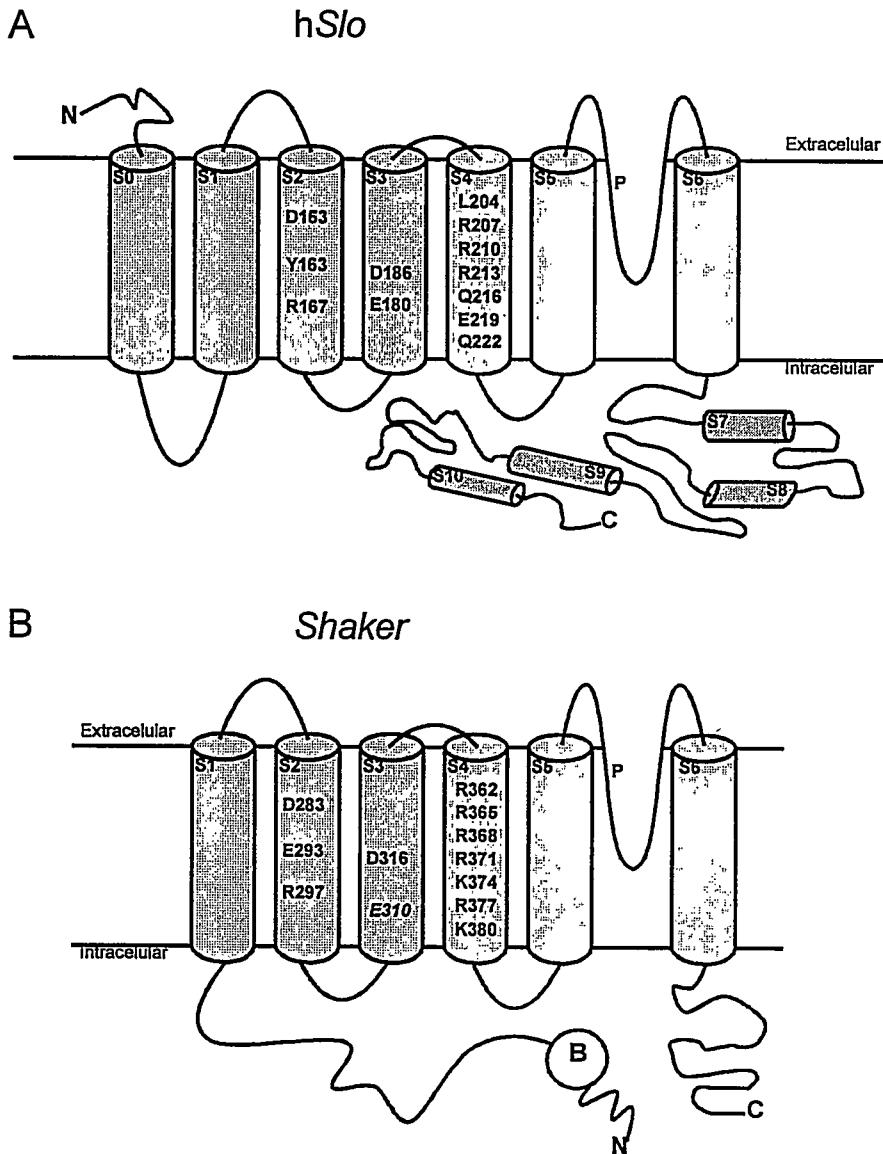
de  $K^+$  activada por calcio,  $I_{CF}$ , (Atkinson y col. 1991; Elkins y col. 1986; Komatsu y col. 1990; Wu y Ganetzky 1992; Saito y Wu 1991), y dada la similitud del péptido *Slo* con las secuencias de los canales  $K_v$  conocidos en ese momento, se propuso que *Slo* era un componente estructural de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (Atkinson y col. 1991).

Esta proposición fue comprobada posteriormente cuando el canal  $K_{Ca}$  de *Drosophila* fue clonado y expresado funcionalmente en oocitos de *Xenopus laevis* (Adelman y col. 1992). La estructura primaria deducida que obtuvieron estos autores conservaba las características descritas anteriormente para *dSlo* (Atkinson y col. 1991); así también, las características electrofisiológicas de los canales expresados fueron coincidentes con las características descritas para los canales de  $K_{Ca}$  (Adelman y col. 1992; Latorre y col. 1989). Entre otras se puede mencionar que los canales expresados mostraron una sensibilidad al  $Ca^{2+}$  interno y una dependencia del potencial comparables a las descritas previamente para los canales  $K_{Ca}$ ; la conductancia del canal único fue 120 pS (en 120 mM de  $K^+$  simétrico); los canales fueron insensibles a los bloqueadores peptídicos apamina y caribdotoxina, y fueron inhibidos por el tetraetilamonio con alta afinidad por el lado externo ( $K_D \approx 100 \mu M$ , a 100 mV) y con baja afinidad por el lado interno ( $K_D \approx 30 mM$ , a 100 mV; Adelman y col. 1992).

### 3.3 Características generales de los canales *slowpoke*.

En los años siguientes se clonaron canales  $K_{Ca}$  homólogos a *dSlo*, de cerebro y músculo esquelético de ratón (*mSlo*, Butler y col. 1993; Pallanck y Ganetzky 1994) de cerebro humano (*hSlo*, Dworetzky y col. 1994; Pallanck y Ganetzky 1994; Tseng-Crank y col. 1994), de músculo liso de útero (Wallner y col. 1995) y aorta humanos (McCobb y col. 1995) y del nemátodo *C. elegans* (Wei y col. 1996). Las estructuras primarias de estos canales clonados tienen entre sí un alto grado de identidad. Estos canales se pueden agrupar en una familia denominada *slowpoke*, que posee las siguientes características (Atkinson y col. 1991; Adelman y col. 1992; Butler y col. 1993; Dworetzky y col. 1994; Pallanck y Ganetzky 1994; Tseng-Crank y col. 1994; McCobb y col. 1995; Wallner y col. 1995; Wei y col. 1996):

- i. La estructura primaria del extremo amino de los canales  $K_{Ca}$  comprende siete segmentos hidrófobos putativamente transmembranales (S0 a S6) y un lazo entre los segmentos S5 y S6 que formaría parte de la vía de conducción (lazo P o H5; Fig. 1A). Esta región es análoga a la estructura central de seis segmentos transmembranales y una región del poro (Fig. 1B) de uno de los monómeros que constituyen a los canales  $K_v$  (Jan y Jan 1992).
- ii. Los segmentos transmembranales S2, S3 y S4 de los canales  $K_{Ca}$  clonados poseen residuos cargados conservados en relación a los canales  $K_v$  (Jan y Jan 1990; Wallner y col. 1996). En el segmento S4 de los canales  $K_{Ca}$  se conserva parcialmente el patrón típico compuesto de cuatro a siete residuos positivos separados entre sí por dos



**Figura 1.** Esquema de la conformación putativa en la membrana del canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , *hSlo*, y del canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker*.

**A.** El canal  $K_{Ca}$  *hSlo* posee siete segmentos hidrófobos transmembranales, denominados S0 a S6, y un lazo P, que forma parte de la vía de conducción. Los dominios S1 a S6 y el lazo P son análogos a las regiones equivalentes que se encuentran en *Shaker* (Fig. 1B). El segmento hidrófobo transmembranal S0 presente en el extremo amino de *hSlo* permite la regulación por la subunidad  $\beta$  (Wallner y col. 1996; Meera y col. 1997). En la porción carboxilo terminal de *hSlo*, se encuentran 4 segmentos hidrófobos (S7 a S10), de los cuales al menos S9 y S10 son citoplasmáticos (Meera y col. 1997). **B.** El canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker* posee seis segmentos hidrófobos transmembranales (S1 a S6) y un segmento hidrófobo P, que forma parte de la vía de conducción. Se indica además la región amino terminal citoplasmática que forma el dominio inactivante N o "bola" (B).

aminoácidos hidrófobos, que está presente en los canales  $K_v$  e incluso en los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial (Fig. 2A). La región S4 de los canales *slo* posee sólo tres argininas. En las posiciones restantes de *slo* el primer residuo positivo en el canal de  $K^+$  *Shaker* está sustituido por un aminoácido hidrófobo (leucina, L); el segundo y el cuarto por uno polar (glutamina, Q) y el último por uno cargado negativamente (aspartato, D, o glutamato, E). (Fig. 2A).

En el segmento S2 de los canales  $K_{Ca}$  *slowpoke*, hay un aminoácido positivo y otro negativo que están conservados en los canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial. Un tercer aminoácido, que es negativo en estos canales, está reemplazado por una tirosina en los canales *slowpoke* (Fig. 2B). Por último, en el segmento S3 se encuentra un residuo negativo (aspartato) que está absolutamente conservado en la familia de los canales del S4 (Fig. 2C).

iii. Los canales *slowpoke* poseen una gran cola carboxilo terminal. Esta región comprende cerca del 70% de la estructura primaria de estos canales y posee cuatro segmentos hidrófobos adicionales, denominados S7 a S10 (Fig. 1A). Entre los segmentos S8 y S9 existe un lazo que no es conservado entre los canales *slowpoke* de *Drosophila* y los de vertebrados. Sin embargo, en la región comprendida entre los segmentos S9 y S10 se encuentra la mayor identidad en el grupo. Recientemente se propuso que la gran cola carboxilo sería un dominio citoplasmático en el cual se ubicaría el o los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  de estos canales (Moss y col. 1996). Las bases para esta proposición provienen de la interacción del inhibidor de la tripsina pancreática de bovino (BPTI) con la tripsina y con los canales  $K_{Ca}$ , y por otro lado, de

la similitud de la estructura primaria conocida y secundaria predicha de la región carboxilo terminal de los canales  $K_{Ca}$  con la estructura primaria y secundaria conocidas de la tripsina. El péptido BPTI es capaz de inhibir a la tripsina pancreática y a otras proteasas de estructura similar. A su vez, el BPTI añadido en el lado intracelular es capaz de inducir subestados de conductancia en los canales  $K_{Ca}$ , efecto que es revertido específicamente por la adición de tripsina. Análisis de secuencia indicaron que la región carboxilo terminal que comprende al segmento S10 del canal  $K_{Ca}$  de bovino posee un alto grado de similitud con la secuencia primaria de la tripsina, y su estructura secundaria predicha podría conformar un dominio con estructura terciaria similar a la de la tripsina pancreática (Moss y col. 1996). Notablemente, estas proteasas poseen un lazo de unión de  $Ca^{2+}$  caracterizado por la presencia de múltiples residuos negativos. Los canales  $K_{Ca}$  poseen en esta zona una región rica en residuos negativos, que formaría un dominio de unión de  $Ca^{2+}$  equivalente al de la proteasa (Moss y col. 1996). Existen dos líneas de resultados que concuerdan con esta hipótesis: a. Experimentos diseñados para establecer la topología del canal  $K_{Ca}$  *hSlo* indican que los segmentos S9 y S10 y el lazo entre ellos donde se ubica el dominio putativo de unión al  $Ca^{2+}$ , parecen ser intracelulares (Meera y col. 1997); b. Experimentos de mutagénesis de la región de residuos negativos indican que dicho dominio forma parte de un sitio de unión de  $Ca^{2+}$  involucrado en la activación del canal (Schreiber y Salkoff, 1997).

**A**

**S2**

<i>hSlo</i>	K D F T L Q I <b>D</b> M A F N V F F L L Y F G L <b>R</b> F I A A N D <b>K</b> L	175
<i>dSlo</i>	N N I T Q Q I <b>D</b> L A F N I F F M V Y F F I <b>R</b> F I A A S D <b>K</b> L	190
<i>Kv1_3</i>	S D P F F V V <b>E</b> T L C I I W F S F <b>E</b> L L V <b>R</b> F F A C P S <b>K</b> A	269
<i>Shaker</i>	T D P F F L I <b>E</b> T L C I I W F T F <b>E</b> L T V <b>R</b> F L A C P N <b>K</b> L	305
<i>Kv2_1</i>	N P Q L A H V <b>E</b> A V C I A W F T M <b>E</b> Y L L <b>R</b> F L S S P <b>K</b> K W	251
<i>Shab</i>	N P Q L A M V <b>E</b> A V C I T W F T L <b>E</b> Y I L <b>R</b> F S S S P D <b>K</b> W	500
<i>Kv3_1</i>	E A F L T Y I <b>E</b> G V C V V W F T F <b>E</b> F L M <b>R</b> V V F C P N <b>K</b> V	271
<i>Shaw</i>	H I A F F Y I <b>E</b> C V C N A W F T F <b>E</b> I L V <b>R</b> F I S S P N <b>K</b> W	257
<i>Kv4</i>	P T A F F C M <b>D</b> T A C V L I F T G <b>E</b> Y L L <b>R</b> L F A A P S <b>R</b> C	257
<i>Shal</i>	K I V F F C L <b>D</b> T A C V M I F T A <b>E</b> Y L L <b>R</b> L F A A P D <b>R</b> C	245
<i>Ca_I</i>	S R R L E K T <b>E</b> P Y F I G I F C F <b>E</b> A G I <b>K</b> I V A L G F I F	153
<i>Ca_II</i>	T H L L Y Y A <b>E</b> F L F L G L F L L <b>E</b> M S L <b>K</b> M Y G M G P <b>R</b>	533
<i>Ca_III</i>	N K V L R Y F <b>D</b> Y V F T G V F T F <b>E</b> M V I <b>K</b> M I D Q G L I L	1214
<i>Ca_IV</i>	E L A L K Y L N I A F T M V F S L <b>E</b> C V L <b>K</b> V I A F G F L	1534
<i>Na_I</i>	P S W S K H V <b>E</b> Y T F T G I Y T F <b>E</b> S L I <b>K</b> M L A R G F C I	186
<i>Na_II</i>	D N V L S V G N L V F T G I F T A <b>E</b> M V L <b>K</b> L I A M D P Y	629
<i>Na_III</i>	R T I L E Y A <b>D</b> K V F T Y I F I L <b>E</b> M L L <b>K</b> W V A Y G F <b>K</b>	1083
<i>Na_IV</i>	V D I L Y N I N M V F I I F T G <b>E</b> C V L <b>K</b> M F A L R H	1402

**B**

**S3**

<i>hSlo</i>	W F W L E V N S V V <b>D</b> F F T V P P V F V S V Y L N	200
<i>dSlo</i>	W F M L E M Y S F V <b>D</b> Y F T I P P S F V S I Y L D	215
<i>Kv1_3</i>	T F S R N I M N L I <b>D</b> I V A I I P Y F I T L G T E L	295
<i>Shaker</i>	N F C R D V M N V I <b>D</b> I I A I I P Y F I T L A T V V	331
<i>Kv2_1</i>	K F F K G P L N A I <b>D</b> L L A I L P Y Y V T I F L T E	277
<i>Shab</i>	K F F K G G L N I I <b>D</b> L L A I L P Y F V S L F L L E	526
<i>Kv3_1</i>	E F I K N S L N I I <b>D</b> F V A I L P F Y L E V G L S G	299
<i>Shaw</i>	E F I K S S V N I I <b>D</b> Y I A T L S F Y I D L V L Q R	281
<i>Kv4</i>	R F L R S V M S L I <b>D</b> V V A I L P Y Y I G L F V P K	283
<i>Shal</i>	K F V R S V M S I I <b>D</b> V V A I M P Y Y I G L G I T D	281
<i>Ca_I</i>	S Y L R N G W N V M <b>D</b> F I V V L S G I L A T A G T H	179
<i>Ca_II</i>	L Y F H S S F N C F <b>D</b> F G V T V G S I F E V V W A I	559
<i>Ca_III</i>	S Y F R D L W N I L <b>D</b> F V V V V G A L V A F A L A N	1240
<i>Ca_IV</i>	N Y F R D T W N I F <b>D</b> F I T V I G S I T E I I L T D	1560
<i>Na_I</i>	T F L R D P W N W L <b>D</b> F S V I T M A Y V T E	209
<i>Na_II</i>	Y Y F Q Q G W N I F <b>D</b> S I I V I L S L M E L G L S	798
<i>Na_III</i>	V Y F T N A W C W L <b>D</b> F L I V D V S I I S L V A N W	1109
<i>Na_IV</i>	Y Y F T I G W N I F <b>D</b> F V V V I L S I V G L A L S D	1428

**Figura 2.** Alineamiento de las regiones S2, S3 y S4 de los canales *hSlo* y *dSlo* con canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial.

La parte C y la leyenda de la figura se encuentran en la próxima página.

C

S4

<i>hSlo</i>	R	S	W	L	G	L	R	F	L	R	A	L	R	L	I	Q	F	S	E	I	L	Q	F	L	N	I	L	K	T	S	230					
<i>dSlo</i>	R	T	W	I	G	L	R	F	L	R	A	L	R	L	M	T	V	P	D	I	L	Q	Y	L	N	V	L	K	T	S	245					
<i>Kv1_3</i>	M	S	L	A	I	L	R	V	I	R	L	V	R	V	F	R	I	F	K	L	S	R	H	S	K	G	L	Q	I	L	G	Q	S	L	K	340
<i>Shaker</i>	M	S	L	A	I	L	R	V	I	R	L	V	R	V	F	R	I	F	K	L	S	R	H	S	K	G	L	Q	I	L	G	R	T	L	K	390
<i>Kv2_1</i>	N	V	R	R	V	V	Q	I	F	R	I	M	R	I	L	R	I	L	K	L	A	R	H	S	T	G	L	Q	S	L	G	F	T	L	R	321
<i>Shab</i>	D	V	R	R	V	V	Q	V	F	R	I	M	R	I	L	R	V	L	K	L	A	R	H	S	T	G	L	Q	S	L	G	F	T	L	R	571
<i>Kv3_1</i>	D	V	L	G	F	L	R	V	V	R	F	V	R	I	L	R	I	F	K	L	T	R	H	F	V	G	L	R	V	L	G	H	T	L	R	339
<i>Shaw</i>	A	K	A	D	I	L	E	F	F	S	I	I	R	I	M	R	L	F	K	L	T	R	H	S	S	G	L	K	I	L	I	Q	T	F	R	323
<i>Kv4</i>	D	V	S	G	A	F	V	T	L	R	V	F	R	V	F	R	I	F	K	F	S	R	H	S	Q	G	L	R	I	L	G	Y	T	L	K	320
<i>Shal</i>	D	V	S	G	A	F	V	T	L	R	V	F	R	V	F	R	I	F	K	F	S	R	H	S	Q	G	L	R	I	L	G	Y	T	L	K	318
<i>Ca_I</i>	N	T	H	V	D	L	R	T	L	R	A	V	R	V	L	R	P	L	K	L	V	S	G	I	P	S	L	Q	I	V	L	K	S	I	M	215
<i>Ca_II</i>	G	T	S	F	G	I	S	V	L	R	A	L	R	L	L	R	I	F	K	I	T	K	Y	W	A	S	L	R	N	L	V	V	S	L	M	597
<i>Ca_III</i>	R	D	I	K	T	I	K	S	L	R	V	L	R	V	L	R	P	L	K	T	I	K	R	L	P	K	L	K	A	V	F	D	C	V	V	1282
<i>Ca_IV</i>	T	S	G	F	N	M	S	F	L	K	L	F	R	A	A	R	L	I	K	L	L	R	Q	G	Y	T	I	R	I	L	L	W	T	F	V	1600
<i>Na_I</i>	F	D	L	G	N	I	S	A	L	R	T	F	R	V	L	R	A	L	K	T	I	T	V	I	P	G	L	K	T	I	V	G	A	L	I	244
<i>Na_II</i>	R	M	G	N	L	V	S	V	L	R	S	F	R	L	L	R	V	F	K	L	A	K	S	W	P	T	L	N	T	L	I	K	I	I	G	833
<i>Na_III</i>	S	E	L	G	P	I	K	S	L	R	T	L	R	A	L	R	P	L	R	A	L	S	R	F	E	G	M	R	V	V	V	N	A	L	L	1147
<i>Na_IV</i>	V	S	P	T	L	F	R	V	I	R	L	A	R	I	G	R	V	L	R	L	I	R	G	A	K	G	I	R	T	L	L	F	A	L	M	1469

**Figura 2.** Alineamiento de los canales *hSlo* y *dSlo* con diversos canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> dependientes del potencial.

Los segmentos transmembranales putativos S2, S3 y S4 (A, B y C respectivamente) se indican con barras horizontales en cada caso. Los segmentos se definieron de acuerdo al análisis de hidrofobicidad y a la abundancia de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos conservados cargados negativa y positivamente se destacan con fondo gris claro y gris oscuro, respectivamente. Los números ubicados a la derecha de cada alineamiento indican la posición del último aminoácido. (Figura modificada de Wallner y col. 1996).

iv. La región amino terminal de los canales K<sub>Ca</sub> posee un segmento hidrófobo adicional denominado S0 (Fig. 1A). Recientemente se demostró que este segmento es transmembranal y dirige el extremo amino terminal hacia el medio extracelular (Wallner y col. 1996; Meera y col. 1997). La estructura de esta región, que es una característica exclusiva de los canales K<sub>Ca</sub>, tiene un correlato funcional claro pues confiere a estos canales la capacidad de ser modulados por la subunidad β del canal K<sub>Ca</sub> (Meera y col. 1996; Wallner y col. 1996).

### 3.4 Los canales $K_{Ca}$ son tetrámeros.

A diferencia de los  $K_v$  de la familia S4, tanto los canales de  $Na^+$  como los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial están formados por un solo polipéptido que posee cuatro dominios o "pseudosubunidades". Cada uno de estos dominios posee seis segmentos transmembranales (Hille, 1992). Esta observación llevó a pensar que los canales  $K_v$  podrían ser homotetrámeros del péptido de seis segmentos transmembranales. La hipótesis fue demostrada experimentalmente para los canales de  $K^+$  dependientes de potencial *Shaker* (*Sh*) (ver Fig. 1B) y el homólogo de mamíferos  $Kv1.1$ , haciendo uso de canales mutantes que poseen alterada la sensibilidad a ciertos bloqueadores (MacKinnon, 1991; Liman y col. 1992).

Por analogía con los canales de la familia S4 se ha pensado que los canales  $K_{Ca}$  son también tetrámeros. Los resultados que apoyan esta hipótesis provinieron de experimentos con canales silvestres y heterotetraméricos con una o más subunidades mutantes, con afinidad reducida al bloqueador TEA. En general los canales  $K_{Ca}$  son bloqueados por el TEA con alta afinidad desde la cara extracelular (Vergara y col. 1984; Latorre, 1994): la constante de disociación ( $K_d$ ) del bloqueo por TEA de los canales *dSlo* es  $\approx 170 \mu M$ , a 40 mV. Esto es consistente con la presencia de un residuo tirosina (Y308 en *dSlo*) en una posición equivalente a la posición que determina la sensibilidad al TEA en los canales  $K_v$ . A su vez, el mutante de *dSlo* Y308V es poco afín por el TEA ( $K_d \approx 29.5 mM$ , a 40 mV; Shen y col. 1994). Cuando se coexpresó una mezcla de RNA que codifican subunidades *dSlo* silvestres y mutantes (Y308V), se observó que las

corrientes de los canales únicos eran normales en ausencia de TEA. Sin embargo, en presencia de TEA 3 mM las corrientes unitarias desplegaron cuatro amplitudes discretas, correspondientes a un 25%, 50%, 75% y 95% de la amplitud observada en ausencia de TEA (Shen y col. 1994).

El grado de inhibición de la corriente pudo ser modelado haciendo las siguientes suposiciones: **a.** En analogía con los canales iónicos dependientes del potencial, los canales  $K_{Ca}$  son tetrámeros; **b.** La unión de TEA a la boca externa del canal es estabilizada por contribuciones iguales de cada uno de los residuos en posición 308 (tirosina en el canal silvestre) cuando el canal es homomérico. Esta suposición fue demostrada previamente para el canal de  $K^+$  *Shaker* (Heginbotham y MacKinnon, 1992), donde el TEA interactúa con el residuo 449, equivalente al residuo 308 de *dSlo*. Para el canal *Shaker*, los resultados obtenidos se modelaron suponiendo que la energía libre para la unión de TEA ( $\Delta G^0$ ) está dada por la suma de las energías libres de la interacción del residuo en posición 449 en cada subunidad, con el TEA (Heginbotham y MacKinnon, 1992).

A partir de estas consideraciones y de los valores experimentales de las  $K_d$  obtenidas para la interacción de TEA con *dSlo* silvestre (Y308) y el mutante Y308V, Shen y col. (1994) calcularon las constantes de disociación esperadas para canales *dSlo* que poseen uno, dos o tres residuos tirosina en posición 308. Las constantes obtenidas se usaron para calcular el grado de inhibición de la corriente para una concentración de TEA dada. La inhibición calculada se ajustó a la obtenida experimentalmente en un

intervalo de potenciales, indicando que la suposición que el canal *dSlo* es un homotetrámero es correcta (Shen y col. 1994).

### 3.5 Canales de $K^+$ de baja conductancia, dependientes de $Ca^{2+}$ (SK).

El clonamiento reciente de los canales de  $K^+$  de baja conductancia, dependientes de  $Ca^{2+}$  (SK) demostró que estos canales también tienen un patrón de hidrofobicidad de seis segmentos hidrófobos y una región P (Khöler y col. 1996). Estos segmentos son análogos a los que se encuentran en los canales  $K_{Ca}$  y en los canales  $K_v$ , por lo cual es probable que la topología transmembranal de los canales SK sea similar a la de los canales  $K_{Ca}$ . Sin embargo, la carencia de identidad significativa entre las secuencias aminoacídicas de ambos tipos de canales ubica a los canales SK en un grupo estructuralmente poco relacionado a los canales  $K_{Ca}$  (Khöler y col. 1996).

## 4. Características de la activación de los canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$ .

Una de las características más conspicuas de los canales de  $K^+$  de gran conductancia, activados por el  $Ca^{2+}$ , se observa en la figura 3. A un potencial constante, el tiempo que el canal reside en el estado abierto ( $P_o$ , la probabilidad del estado abierto), aumenta cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  en la cara interna de la membrana ( $[Ca^{2+}]_i$ ) se incrementa. Como se mencionara anteriormente, la  $P_o$  también crece cuando el potencial transmembranal aumenta (Fig. 3B) (Blatz y Magleby, 1987; Latorre y col. 1989; Latorre 1994; McManus 1991). Estos rasgos han hecho de los canales  $K_{Ca}$  un modelo

experimental especialmente atractivo para el estudio de los procesos que confieren la dependencia de potencial a la activación (“gating”).

#### 4.1 Dependencia del $Ca^{2+}$ de la probabilidad del estado abierto de los canales $K_{Ca}$ .

La activación de los canales  $K_{Ca}$  inducida por el calcio puede ser descrita en términos de un esquema de reacción en que un canal en el estado cerrado (C) une  $N$  iones  $Ca^{2+}$ , dando como resultado final un canal abierto con  $N$  iones  $Ca^{2+}$  unidos ( $O-Ca^{2+}_N$ ):



De este modo, la dependencia del  $Ca^{2+}$  de la  $P_o$  en estado estacionario, se puede describir con la relación:

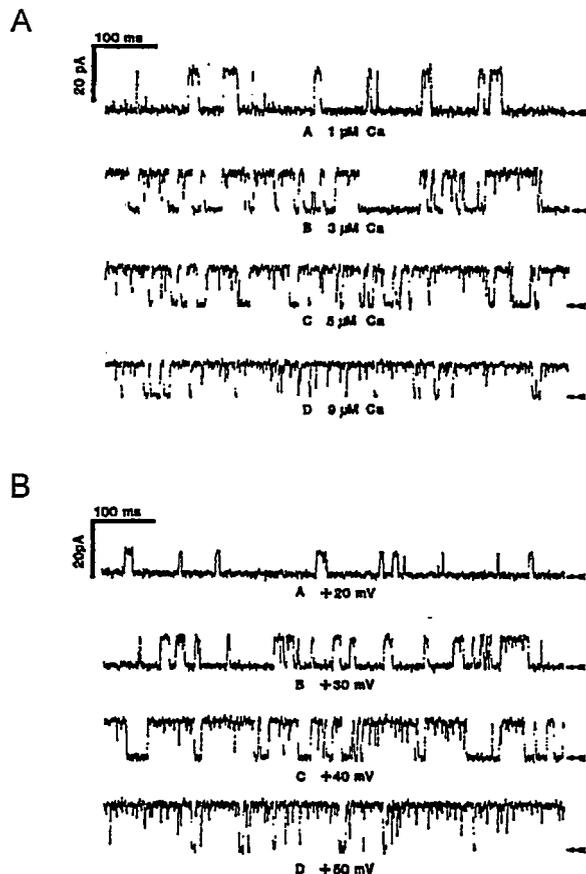
$$P_o = P_o^{max} [Ca^{2+}]^N / ([Ca^{2+}]^N + K_d) \quad (1)$$

donde  $P_o^{max}$  es la probabilidad máxima del estado abierto,  $K_d$  es la constante de disociación aparente y  $N$ , es el coeficiente de Hill (Latorre 1994; McManus 1991).

##### 4.1.1 Los canales $K_{Ca}$ poseen diversas sensibilidades aparentes al $Ca^{2+}$ .

La sensibilidad aparente al  $Ca^{2+}$  de los canales  $K_{Ca}$  varía dependiendo del origen del canal. La mayor sensibilidad se observa en los canales  $K_{Ca}$  de la glándula lacrimal de

ratón ( $K_d \approx 10$  nM); sensibilidades intermedias se encuentran en los canales de músculo liso ( $K_d \approx 1$   $\mu$ M), siendo los canales  $K_{Ca}$  de músculo esquelético los más insensibles ( $K_d > 1$   $\mu$ M; Latorre 1989; McManus 1991). La sensibilidad diferencial puede en parte estar dada por la presencia de la subunidad  $\beta$  del canal  $K_{Ca}$ , en la preparación en estudio (García-Calvo y col. 1994; Knaus y col. 1994). Uno de los efectos de esta subunidad accesoria es aumentar dramáticamente la sensibilidad aparente al  $Ca^{2+}$  de los canales  $K_{Ca}$ , disminuyendo entre uno a tres órdenes de magnitud la  $[Ca^{2+}]$  necesaria para alcanzar el 50% de la  $P_o^{max}$  (McManus y col. 1995; Wallner y col. 1995; Meera y col. 1996).



**Figura 3.** Efectos del  $Ca^{2+}$  y del potencial en la actividad del canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , de músculo esquelético de rata.

A. La probabilidad del estado abierto,  $P_o$ , varió en función del  $Ca^{2+}$ , desde 0,22 con 1  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$  (registro superior), a 0,66 con 3  $\mu$ M (2° registro), a 0,81 con 5  $\mu$ M (3° registro) y 0,93 con 9  $\mu$ M (4° registro). El potencial de mantención fue 40 mV. B. La  $P_o$  aumenta cuando a una  $[Ca^{2+}]$  constante (3  $\mu$ M) se incrementa el potencial. Las  $P_o$  fueron 0,16 (20 mV, registro superior), 0,29 (30 mV, 2° registro) 0,66 (40 mV, 3° registro), y 0,87 (50 mV, registro inferior). (Figura modificada de Moczydlowski y Latorre, 1983).

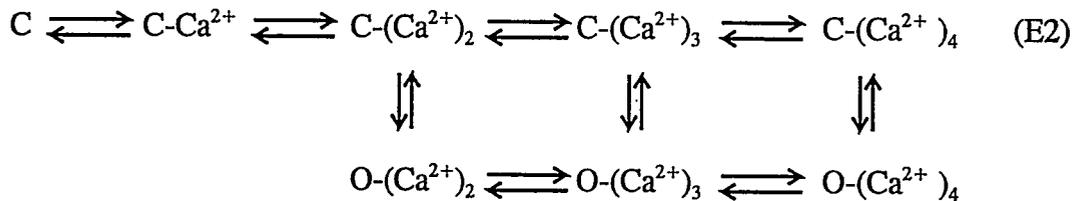
#### 4.1.2 *El coeficiente de Hill sugiere más de dos sitios de $\text{Ca}^{2+}$ en los canales $K_{\text{Ca}}$ .*

El coeficiente de Hill,  $N$ , es reflejo de la pendiente de la relación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y la probabilidad del estado abierto ( $P_o$ ), y da una estimación del número mínimo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que activan máximamente al canal (Latorre 1989; Latorre 1994; McManus 1991). El número de Hill determinado para la mayoría de los canales  $K_{\text{Ca}}$  varía entre 2 y 3, pero excepcionalmente se han encontrado valores menores cercanos a 1 y números máximos cercanos a 6 (Ikemoto y col. 1989; Latorre 1989; Markwardt e Isenberg 1992; McManus 1991; McManus y Magleby 1991; Latorre 1994). De este modo, los datos indican que en general, los canales  $K_{\text{Ca}}$  poseen al menos tres sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  que están acoplados a la activación.

#### 4.1.3 *Modelos cinéticos que explican la dependencia de $\text{Ca}^{2+}$ de la activación de los canales $K_{\text{Ca}}$ .*

Uno de los objetivos primordiales de la investigación de los mecanismos de activación de los canales  $K_{\text{Ca}}$ , es establecer un modelo cinético que sea capaz de describir la conducta de la activación de los canales  $K_{\text{Ca}}$ . Si el canal une  $N$  iones  $\text{Ca}^{2+}$ , en principio debiera haber al menos  $N + 1$  estados cerrados y abiertos. Cuando se usó una resolución temporal alta en la adquisición de datos, se pudo resolver hasta cinco componentes exponenciales en las distribuciones de tiempo de permanencia para los estados cerrados y tres componentes para los estados abiertos (McManus y Magleby,

1991). Estos autores hicieron una búsqueda sistemática del esquema cinético mínimo que pudiera explicar la dependencia del  $Ca^{2+}$  de los datos cinéticos y de equilibrio, y encontraron que el modelo debía tener cinco estados cerrados (C) y tres abiertos (O):



El modelo lineal con un número equivalente de estados cerrados y abiertos fue descartado pues se describió una relación inversa entre el tiempo de permanencia en el estado cerrado y el tiempo de permanencia en el estado abierto adyacente, y viceversa (McManus y Magleby, 1985; 1991).

#### 4.2 Dependencia del potencial de la probabilidad del estado abierto de los canales

$K_{Ca}$ .

La dependencia del potencial de la probabilidad del estado conductor ( $P_o$ ) es usualmente descrita por (Lecar y col. 1975):

$$P_o = P_o^{max} \cdot \{1 + \exp [ - (V - V_o) / A ]\}^{-1} \quad (2)$$

donde  $A$  es el factor de pendiente que contiene la dependencia del potencial eléctrico de la activación del canal y  $V_o$  es el potencial al cual  $P_o = 0.5 \cdot P_o^{max}$ . Si la activación se describe con un modelo de dos estados,  $A = R \cdot T / (z' \cdot F)$ . En este caso,  $z' = z\delta$ , producto insoluble de  $z$  cargas o partículas de activación que se mueven una distancia eléctrica  $\delta$  del campo eléctrico transmembranal. Esta aproximación ha sido usada por

diversos autores, quienes han obtenido factores de pendiente tan altos como 42 mV y tan bajos como 8 mV (Latorre 1994; Markwardt e Isenberg, 1992; Reinhart y col. 1989). Estos valores indican que en los canales  $K_{Ca}$  se mueven entre 0,6 a 3 cargas equivalentes en el campo eléctrico, respectivamente, lo que se contrasta con el movimiento de 2 a 13 partículas de activación en los canales  $K_v$ , donde el factor de pendiente  $A$  oscila entre 2 mV a 12 mV (Latorre 1994). Se puede concluir entonces que la dependencia del potencial de los canales  $K_{Ca}$  es, por lo general, menor que la dependencia del potencial de los canales  $K_v$ .

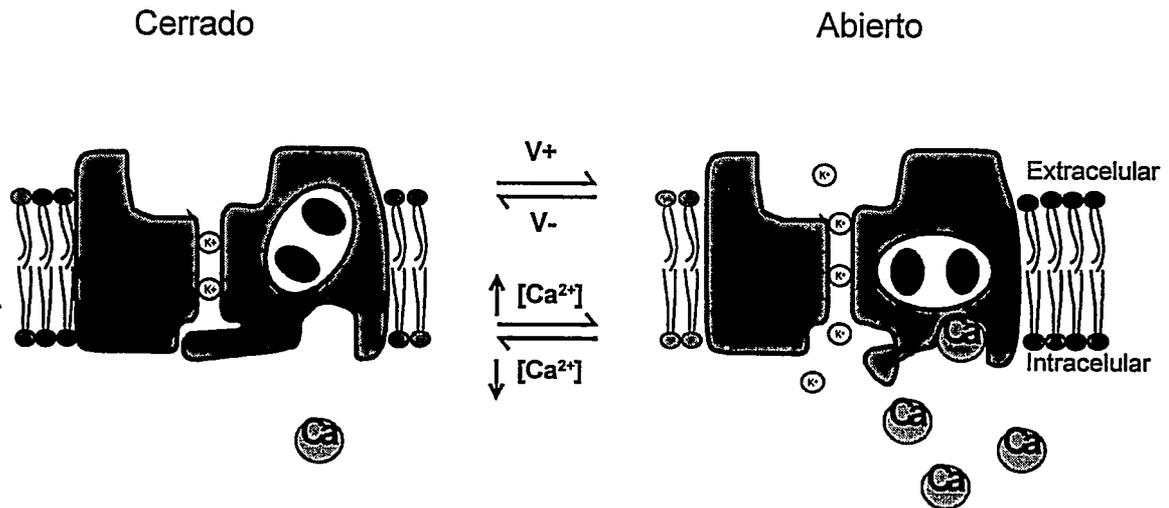
#### 4.2.1 Modelos que explican la dependencia del potencial de los canales $K_{Ca}$ .

La dependencia del potencial eléctrico de los canales iónicos fue explicada postulando la existencia de un sensor de potencial (Hodgkin y Huxley, 1952). Este modelo, denominado aquí modelo de "*dependencia intrínseca del potencial*" (Fig. 4), es aplicable a los canales de  $K^+$  dependientes del  $Ca^{2+}$ ; sin embargo, dado que los canales  $K_{Ca}$  son dependientes del potencial eléctrico y sensibles al  $Ca^{2+}$ , existe un modelo alternativo capaz de explicar la dependencia del potencial de estos canales, llamado modelo de "*activación iónica*" (Fig 5; Moczydlowski y Latorre, 1983; Gorman y Thomas, 1980).

#### 4.2.1.1 Dependencia intrínseca del potencial.

Las partículas de activación o “*gating*” propuestas por Hodgkin y Huxley (1952) son partículas con carga eléctrica neta o dipolares, que se encuentran en una región de la proteína canal que esta ubicada en el campo eléctrico transmembranal. La dependencia del potencial de la conductancia iónica surge entonces de la alteración de la posición de las particular cargadas o de la orientación de dipolos, como consecuencia de un cambio del campo eléctrico. Este desplazamiento de carga intramembranal se acoplaría a la apertura del canal (Fig. 4). Los autores sugirieron además que el cambio de posición u orientación del sensor cargado inducido por el cambio del potencial de membrana, generaría una corriente que contribuiría a la corriente total (Hodgkin y Huxley, 1952). Este componente de la corriente, denominado corriente de “*compuerta*” (corriente de “*gating*”) se registró con posterioridad a partir de los canales de  $\text{Na}^+$  del axón de calamar y de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del músculo esquelético (Armstrong y Bezanilla, 1973; Schneider y Chandler 1973). La identidad molecular del sensor de potencial eléctrico permaneció desconocida por años hasta que el clonamiento de los primeros canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  dependientes del potencial permitió deducir la estructura primaria de las proteínas que forman estos canales (Noda y col. 1984; Noda y col. 1986; Papazian y col. 1987; Tempel y col. 1987; Tanabe y col. 1987; Tanabe y col. 1988). Uno de los rasgos más llamativos de la secuencia primaria de estas proteínas es el segmento S4 (ver Fig. 2C). Debido a su carácter hidrófobo se propuso que el segmento S4 era transmembranal lo

que junto a su naturaleza cargada lo hizo un buen candidato a ser el sensor de potencial (Noda y col. 1984; Noda y col. 1986; Papazian y col. 1987; Tempel y col. 1987).

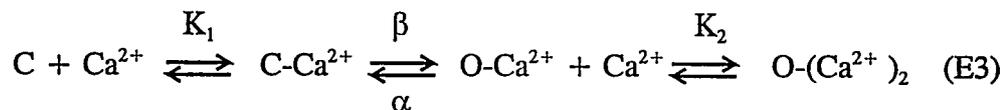


**Figura 4.** Modelo de activación de un canal  $K_{Ca}$ , con dependencia intrínseca del potencial. El sensor intrínseco de potencial se esquematiza como un dipolo. El canal puede existir en dos conformaciones: cerrado y abierto. La despolarización de la membrana induce el movimiento del sensor, que a su vez desplaza el equilibrio hacia el estado abierto del canal. Adicionalmente, la unión de  $Ca^{2+}$  puede inducir el movimiento del sensor y abrir el canal.

#### 4.2.1.2 Activación iónica.

El análisis de la cinética de canales  $K_{Ca}$  únicos permitió proponer además un modelo que explicaba la dependencia del potencial eléctrico de la activación como también la dependencia del  $Ca^{2+}$  y del potencial eléctrico de la  $P_o$  en el equilibrio. Moczydlowski y Latorre (1983), observaron que el tiempo promedio de permanencia en el estado abierto ( $\tau_o$ ) dependía linealmente de la  $[Ca^{2+}]$ , mientras que el tiempo

promedio de permanencia en el estado cerrado ( $\tau_c$ ) dependía linealmente del recíproco de la  $[Ca^{2+}]$ . El hecho que  $\tau_o$  y  $\tau_c$  dependieran de la  $[Ca^{2+}]$ , indicó que el  $Ca^{2+}$  debía estar uniéndose al estado cerrado y al abierto. Adicionalmente se encontró que cuando la  $[Ca^{2+}]$  tendía a cero, el valor al cual tendía el  $\tau_o$  era distinto de cero; análogamente, cuando el inverso de la  $[Ca^{2+}]$  tendía a 0 ( $[Ca^{2+}]$  alta),  $\tau_c$  también tendía a un valor distinto de cero. Para explicar este último resultado fue necesario proponer un modelo en que un ion  $Ca^{2+}$  se une a un estado cerrado ( $C + Ca^{2+} \rightleftharpoons C-Ca^{2+}$ ) y un segundo ion  $Ca^{2+}$  se une a un estado abierto ( $O-Ca^{2+} + Ca^{2+} \rightleftharpoons O-(Ca^{2+})_2$ ), con una transición del cerrado al abierto independiente de la unión calcio al canal ( $C-Ca^{2+} \rightleftharpoons O-Ca^{2+}$ ):



Este es el esquema más simple capaz de explicar la dependencia del  $Ca^{2+}$  de los tiempos promedio de permanencia en el estado cerrado ( $\tau_c$ ) y en el estado abierto ( $\tau_o$ ) pues suponiendo que las reacciones de unión de  $Ca^{2+}$  están en equilibrio con respecto a la transición  $C-Ca^{2+} \rightleftharpoons O-Ca^{2+}$ , se cumple:

$$1 / \tau_c = \beta P_{CCa} \quad (3)$$

$$1 / \tau_o = \alpha P_{OCa} \quad (4)$$

donde  $P_{OCa}$  es la probabilidad condicional del estado  $O-Ca^{2+}$  (dado que el canal se encuentra en los estados  $O-Ca^{2+}$  o  $O-(Ca^{2+})_2$ ) y  $P_{CCa}$  es la probabilidad condicional del estado  $C-Ca^{2+}$  (dado que el canal se encuentra en los estados  $C$  o  $C-Ca^{2+}$ ).

Considerando el esquema E3, las probabilidades condicionales quedan definidas simplemente como:

$$P_{CCa} = Ca^{2+} / (K_1 + Ca^{2+}) \quad (3a)$$

$$P_{OCa} = K_2 / (Ca^{2+} + K_2) \quad (4a)$$

y reemplazando estas expresiones en (3) y (4) respectivamente se obtiene:

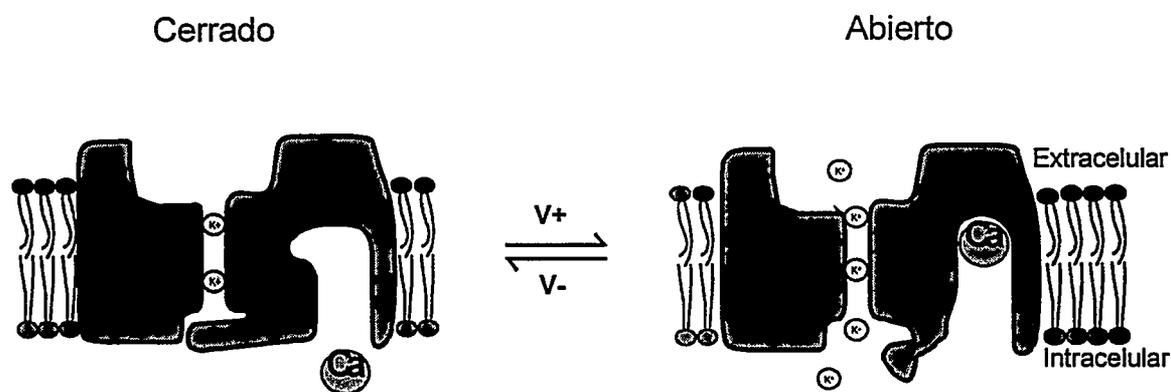
$$\tau_c = 1 / \beta + (K_1 / \beta) \cdot (1 / [Ca^{2+}]) \quad (5)$$

$$\tau_o = 1 / \alpha + [1 / (\alpha + K_2)] \cdot [Ca^{2+}] \quad (6)$$

Las ecuaciones (5) y (6) indican respectivamente que el  $\tau_c$  es inversamente proporcional a la  $[Ca^{2+}]$  y que el  $\tau_o$  es directamente proporcional a la  $[Ca^{2+}]$ . Además, cuando  $1 / [Ca^{2+}]$  tiende a cero (ec. 5) o cuando la  $[Ca^{2+}]$  tiende a cero (ec. 6)  $\tau_c$  y  $\tau_o$  tienden a un límite dado por  $1 / \beta$  y  $1 / \alpha$ , respectivamente. Esta predicción fue corroborada experimentalmente; más aun, se observó que el valor límite de  $\tau_c$  y  $\tau_o$  era independiente del potencial, pero que la pendiente de las relaciones (5) y (6) dependía del potencial. Este resultado indicó que: a.  $\beta$  y  $\alpha$  no dependían del potencial, es decir la transición entre el estado abierto y cerrado era independiente del potencial eléctrico (Moczydlowski y Latorre, 1983), y b. La dependencia del potencial de  $P_o$  no refleja más que la dependencia del potencial de la unión de calcio a su (sus) sitio(s).

Con estos resultados Moczydlowski y Latorre (1983) plantearon que los sitios de unión de  $Ca^{2+}$  estarían en una zona del canal ubicada en el campo eléctrico transmembranal (Fig. 5) (Moczydlowski y Latorre, 1983; Gorman y Thomas, 1980; Markwardt e Isenberg, 1992). Sin embargo, los resultados discutidos pueden ser

explicados por un modelo alternativo en que los sitios de  $\text{Ca}^{2+}$  están fuera del campo eléctrico y por lo tanto la reacción de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  propiamente tal es independiente del voltaje. En este caso la afinidad del sitio por el  $\text{Ca}^{2+}$  es modulada por el potencial a través del acoplamiento de los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  con un sensor intrínseco de potencial que se mueve en respuesta a un cambio del campo eléctrico transmembranal (Moczydlowski y Latorre, 1983).



**Figura 5.** Modelo de *activación iónica* de un canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$ .

El o los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran en un bolsillo de la proteína que se interna en el plano de la membrana, ubicándose en el campo eléctrico transmembranal. De esta forma, el  $\text{Ca}^{2+}$  experimenta la fuerza del campo y tenderá a unirse al sitio cuando la membrana se despolariza. El sitio de  $\text{Ca}^{2+}$  estaría acoplado a la compuerta de activación de manera que cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al sitio, se induce la apertura del canal.

El modelo de activación iónica fue cuestionado por experimentos de modificación química con N-bromoacetamida (NBA) de un canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de rata. En relación al canal no tratado, la modificación redujo notablemente la  $P_0$  e hizo al canal insensible al calcio en el intervalo comprendido entre 1 nM y 100  $\mu\text{M}$  (Pallotta 1985). Adicionalmente, una

población de aperturas de larga duración presente en los canales no tratados, no pudo ser observada en los canales modificados. Notablemente, estos resultados se observaron también en canales no tratados, expuestos a un medio virtualmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ nM}$ ). Sin embargo, el resultado más sorprendente fue que la dependencia del potencial eléctrico del canal no modificado, expuesto a una  $[\text{Ca}^{2+}]$  alta ( $> 1 \mu\text{M}$ ) fue idéntica a la del canal modificado químicamente y a la del canal no modificado expuesto a un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ nM}$ ; Pallotta, 1985). Pallotta (1985) dedujo de estos resultados que la modificación química estaba removiendo la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , pues impedía observar la población de abiertos de larga duración que normalmente se observa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pallotta, 1985). Esta interpretación fue cuestionada a su vez por experimentos de modificación con NBA y digestión con tripsina, que indicaron que el tratamiento no removía la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que solamente la alteraba, pues el canal modificado aun era capaz de responder al  $\text{Ca}^{2+}$  siempre que se utilizara una  $[\text{Ca}^{2+}]$  suficientemente alta (Cornejo y col. 1987; Salomao y col. 1992).

Sin embargo, más allá de toda interpretación, los experimentos de Pallotta (1985) indicaron que el canal podía ser activado por el potencial eléctrico, en un medio virtualmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo la existencia de un mecanismo de activación independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  en los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$ .

#### 4.3 Inactivación en los canales $K_{Ca}$ .

Una propiedad compartida por la gran mayoría de los canales  $K_{Ca}$  es que la conductancia no se inactiva cuando el potencial o la  $[Ca^{2+}]_i$  se mantiene constante (Latorre y col. 1989; McManus 1991). Sin embargo, una población de los canales  $K_{Ca}$  de las células cromafines adrenales de rata y de bovino ( $K_{Ca,i}$ ; Solaro y Lingle, 1992) y una pequeña fracción de los canales  $K_{Ca}$  de hipocampo de rata (Ikemoto y col. 1989) son una excepción notable a esta regla. Los canales  $K_{Ca,i}$  poseen una inactivación rápida, descrita por una constante de tiempo de  $\approx 100$  ms. Esta inactivación (inactivación  $K_{Ca,i}$ ) presenta una dependencia aparente del potencial y de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que es reflejo del grado de activación estacionaria de los canales  $K_{Ca,i}$  (Solaro y Lingle, 1992). Algunos canales  $K_v$  poseen una inactivación similar, denominada inactivación tipo N, dada por el dominio peptídico amino terminal o péptido "bola" (Hoshi y col. 1990). Como en el caso de la inactivación tipo N, la inactivación de los canales  $K_{Ca,i}$  se puede remover al exponer la cara interna de los canales a proteólisis con tripsina (Solaro y Lingle, 1992). Sin embargo, a diferencia del péptido "bola" inactivante tipo N, el dominio citosólico de la inactivación  $K_{Ca,i}$  no se comporta como un bloqueador de canales abiertos. Experimentos con bloqueadores que se unen a la boca interna o en la vía de conducción del canal indican que la barrera al transporte de  $K^+$  que surge con la inactivación  $K_{Ca,i}$  estaría en la porción extracelular de la vía de conducción (Solaro y col. 1997). Así entonces, la inactivación  $K_{Ca,i}$  parece ser un proceso característico de los canales  $K_{Ca,i}$ , con

mecanismos que son diferentes a los descritos para los canales de  $K^+$  dependientes del potencial.

#### 4.4 *El ion $Ba^{2+}$ bloquea a los canales de $K^+$ induciendo una inhibición que imita a la inactivación.*

Una propiedad compartida por los canales de  $K_v$  y  $K_{Ca}$  es que el ion  $Ba^{2+}$  interactúa con la vía de conducción de estos canales y al hacerlo bloquea la conducción de  $K^+$  (Latorre y col. 1997). El  $Ba^{2+}$  puede bloquear a los canales de  $K^+$  desde el lado interno así como desde el lado externo. Esta observación fue hecha por primera vez en los canales de  $K^+$  dependientes del potencial del axón de calamar. Cuando el  $Ba^{2+}$  se encuentra en el lado extracelular es capaz de bloquear tanto a los canales abiertos como a los canales cerrados. Sin embargo desde el lado interno el catión solo puede bloquear el canal una vez que está abierto (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick 1980). Estos resultados indican que la compuerta de activación de los canales de  $K^+$  se encuentra en la cara citoplasmática del canal.

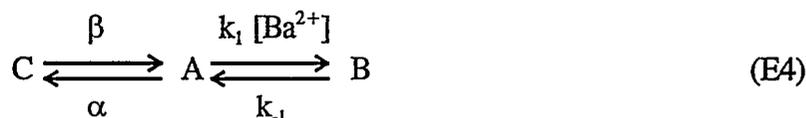
Cuando en presencia de  $Ba^{2+}$  interno una población de canales se activa frente a un pulso de voltaje, se observa una corriente macroscópica que crece de acuerdo a la cinética de activación de los canales, hasta alcanzar un máximo y entonces decaer en el tiempo (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick 1980). Este decaimiento es reflejo de la cinética de bloqueo de la vía de conducción por el  $Ba^{2+}$ . El curso temporal de la corriente en presencia de  $Ba^{2+}$  es cualitativamente indistinguible al de la corriente de

canales que se inactivan. Como se verá en la sección de resultados, el curso temporal de la corriente macroscópica de los canales  $K_{Ca}$  *hSlo* es bifásica, con una fase de ascenso seguida por una de decaimiento. Así entonces, como una condición previa al estudio de los mecanismos que confieren la dependencia del potencial a la activación de *hSlo*, se estudió si el fenómeno de decaimiento observado en *hSlo* corresponde a un proceso de inactivación intrínseco del canal o a un proceso de bloqueo similar al inducido por un bloqueador, como por ejemplo el  $Ba^{2+}$ , presente en el medio interno.

Las características cinéticas y estacionarias del bloqueo por  $Ba^{2+}$  de los canales de  $K^+$  de calamar son consistentes con la interacción de un sólo ion  $Ba^{2+}$  con la vía de conducción. El bloqueo es además dependiente del potencial, haciéndose más rápido y completo a medida que el potencial aumenta (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick 1980; Armstrong y col. 1982). La dependencia del potencial del bloqueo se explicó sugiriendo que el sitio de  $Ba^{2+}$  en la vía de conducción experimenta una fracción  $\delta$  de la fuerza del campo eléctrico transmembranal. La fracción o "*distancia eléctrica*"  $\delta$  reportada para estos canales es  $\approx 1$  (Armstrong y col. 1982). Aunque la interpretación de este resultado no es única (ver Discusión), la determinación sugiere que el sitio se encuentra en una posición en que el campo ha caído cerca de 100%. Dicho de otro modo, para que el  $Ba^{2+}$  interno alcance su sitio, debe avanzar a través de la vía de conducción hasta un punto en que el campo ha caído totalmente (Armstrong y col. 1982).

#### 4.4.1 El ion $Ba^{2+}$ bloquea a los canales $K_{Ca}$ .

El efecto del  $Ba^{2+}$  en los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  se ha estudiado en detalle a nivel de canales únicos reconstituidos en bicapas artificiales (Vergara y Latorre, 1983). La interacción del  $Ba^{2+}$  con los canales  $K_{Ca}$  comparte las siguientes características con la interacción del catión con los canales  $K_V$  de axón de calamar: **a.** El  $Ba^{2+}$  puede bloquear a los canales  $K_{Ca}$  desde el lado externo o desde el lado interno. Desde el lado interno el catión tiene una afinidad por su sitio que es 50 veces mayor que desde el lado extracelular. **b.** El bloqueo se puede modelar con esquema de interacción del  $Ba^{2+}$  con un solo sitio:



donde  $A$  es el estado abierto,  $C$  es el estado cerrado y  $B$  el estado bloqueado. En este caso, el tiempo de permanencia en el estado bloqueado ( $\tau_B$ ) es:

$$\tau_B = 1 / k_1. \quad (7)$$

Dado que en las condiciones experimentales en que se caracterizó el bloqueo las transiciones entre los estados cerrado y abierto son rápidas en relación al bloqueo, se puede distinguir periodos de "actividad" en que el canal fluctúa rápidamente entre  $C$  y  $A$ , de las transiciones al estado bloqueado inducidas por el  $Ba^{2+}$ , que son de larga duración. Así, la duración promedio de los periodos de actividad ( $\tau_A$ ) está dada por:

$$\tau_A = \{1 / (k_1 \cdot [Ba^{2+}])\} \cdot (1 + \alpha / \beta). \quad (8)$$

En las condiciones experimentales usadas se favoreció al estado abierto sobre el cerrado ( $\beta \gg \alpha$ ), de manera tal que la ecuación 8 se reduce a:

$$\tau_A = 1 / (k_1 \cdot [Ba^{2+}]). \quad (8a)$$

Por lo tanto, el modelo de bloqueo predice que el tiempo de permanencia en el estado bloqueado será independiente de la  $[Ba^{2+}]$  y que el inverso de la duración de los periodos de actividad será directamente proporcional a la  $[Ba^{2+}]$ . Este fue exactamente el resultado experimental obtenido. Adicionalmente, dado que la duración de los periodos de actividad,  $\tau_A$ , aumentó a medida que la probabilidad del estado abierto se hizo decrecer (es decir,  $\alpha$  aumentaba), se corroboró que el  $Ba^{2+}$  está bloqueando a los canales abiertos (ec. 8). c. El bloqueo es dependiente del potencial. Como los resultados fueron consistentes con la presencia de un solo sitio para el  $Ba^{2+}$ , la dependencia del potencial observada sugirió que el sitio se encuentra en una posición de la vía de conducción donde el campo eléctrico ha caído aproximadamente un 80% del total (Vergara y Latorre, 1983).

El bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo presenta una dependencia del potencial que sugiere que el sitio al cual el catión accede desde el lado externo es el mismo al cual se une desde el lado interno. La menor afinidad observada para el bloqueo desde el lado externo indica entonces que en este caso el  $Ba^{2+}$  debe vencer una barrera de energía mucho más alta que cuando bloquea desde el lado interno (Vergara y Latorre, 1983).

## 5. Objetivos.

Los experimentos de modificación química (sección 4.2) pusieron nuevamente en debate el mecanismo que origina la dependencia del potencial de la activación de los canales  $K_{Ca}$ . Aunque los resultados cinéticos apoyan el modelo de *activación iónica* no prueban que la unión de  $Ca^{2+}$  sea dependiente del potencial. Por otro lado tampoco hay evidencias que indiquen claramente que los canales  $K_{Ca}$  poseen un sensor de voltaje intrínseco.

### 5.1 Objetivo general.

Por esta razón, el **objetivo general** de esta tesis fue estudiar los **mecanismos responsables de la dependencia del potencial del canal de  $K^+$  dependiente del  $Ca^{2+}$ , *hSlo***. Actualmente hay un gran volumen de evidencia que indica que el dominio S4 forma parte del sensor de voltaje de los canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial. Las líneas de evidencia incluyen experimentos en que la neutralización de un residuo cargado mediante el uso de mutagénesis dirigida reduce la dependencia del potencial de estos canales (Stühmer y col. 1989; Papazian y col. 1991; Planells-Cases y col. 1995; García y col. 1996), modifica las corrientes de compuerta (Perozo y col. 1994) o decrece la carga de compuerta por canal (Aggarwal y McKinnon, 1996; Seoh y col. 1996). Otro tipo de experimentos indican que la accesibilidad de distintos residuos del segmento S4 se modifica dependiendo del grado de activación del canal inducido por el potencial (Yang y Horn, 1995; Mannuzzu y col. 1996; Larsson y col. 1996; Yang y

col. 1996). En el transcurso de esta tesis se reportaron resultados que indican que los canales  $K_{Ca}$  pueden activarse por el potencial eléctrico en forma independiente del  $Ca^{2+}$ , (Meera y col. 1996), sugiriendo fuertemente la existencia de un sensor intrínseco de potencial. Esta hipótesis fue reforzada por los resultados de Stefani y col. (1997), quienes fueron capaces de registrar corrientes de compuerta asociadas a los canales de  $K_{Ca}$ , *hSlo*. En concordancia con los resultados de Meera y col. (1996) la carga máxima de compuerta fue independiente de la  $[Ca^{2+}]$  en el intervalo de 5 nM a 100 nM, intervalo en el cual el canal es capaz de ser activado por el potencial en forma independiente de la  $[Ca^{2+}]$  (Stefani y col. 1996). Más aun, cuando la  $[Ca^{2+}]$  se elevó a 85  $\mu$ M, la carga máxima no aumentó en relación a la carga movida en presencia de 100 nM de  $Ca^{2+}$ , pero el potencial al cual el 50% de la carga máxima se ha movido fue menor (Stefani y col. 1996), indicando que el  $Ca^{2+}$  facilita el movimiento del sensor.

En el contexto discutido en la sección 4.2, se decidió investigar el **papel que tiene el segmento S4 en la activación dependiente del potencial de *hSlo***, planteándose la hipótesis que si un aminoácido cargado del segmento S4 forma parte del sensor intrínseco de potencial, la neutralización de dicho residuo debe disminuir la dependencia del potencial de la activación del canal mutado.

La sola presencia del dominio S4 en los canales  $K_{Ca}$  (ver Fig. 6), no es suficiente para suponer que dicho dominio actúa como sensor del potencial en ellos. Para ilustrar esta afirmación se pueden citar dos ejemplos: i. los canales activados por nucleótidos cíclicos y ii. los canales de  $K^+$  rectificadores de entrada, de *Arabidopsis thaliana*, AKT1 y KAT1.

i. Los canales activados por nucleótidos cíclicos (cNMP) son canales catiónicos, cuya secuencia primaria es parcialmente conservada con la de los canales  $K_v$ . Los canales cNMP poseen el patrón típico de seis segmentos hidrófobos (H1 a H6, análogos a los segmentos S1 a S6) y un lazo entre los segmentos H5 y H6 con homología a la región P de los canales  $K_v$  (Kaupp y col. 1989; Ludwig y col. 1990; Kaupp, 1991; Goulding y col. 1992; Dhallan y col. 1992). El dominio equivalente al segmento S4 tiene tres o cuatro residuos arginina conservados en relación a los canales  $K_v$  (Fig. 6; Kaupp, 1991; Finn y col. 1996), lo que ha llevado a proponer que estos canales pertenecen a la familia de canales S4 (Jan y Jan 1990; Kaupp, 1991). La  $P_o$  de los canales activados por nucleótidos cíclicos es solo residualmente dependiente del potencial, con 0,2 a 0,5 cargas equivalentes asociadas a la activación (Hanke y col. 1988; Goulding y col. 1992). Aunque este resultado concuerda con que la sola presencia del segmento S4 no asegura que el canal sea dependiente del potencial, no se puede descartar, sin embargo, que la casi nula dependencia del potencial se deba a la menor carga neta del segmento S4 dada por los residuos negativos presentes en él (Fig. 6).

ii. Los canales AKT1 (Sentenac y col. 1992) y KAT1 (Anderson y col. 1992), son canales de  $K^+$  que solo conducen corriente cuando la membrana está hiperpolarizada. La estructura terciaria propuesta es similar a la de los canales  $K_v$ , con seis segmentos transmembranales y un lazo que formaría el poro de conducción. El segmento S4 de los canales AKT1 y KAT1 posee cuatro residuos básicos conservados en relación a los canales  $K_v$  (Sentenac y col. 1992; Anderson y col. 1992). Notablemente, la

rectificación de entrada en estos canales se debe una propiedad intrínseca del mecanismo de activación, cuya dependencia del potencial es inversa a la de los canales  $K_v$ : los canales KAT1 y AKT1 se activan con potenciales negativos y se desactivan cuando la membrana se despolariza (Sentenac y col. 1992; Anderson y col. 1992). Como la información existente hasta ahora indica que estos canales tendrían una topología de membrana similar a la de los canales  $K_v$ , la dependencia del potencial de KAT1 y AKT1 no se puede explicar recurriendo al segmento S4 por lo menos de la forma en que se hace para los canales  $K_v$ .

## Región S4

<i>hSlo</i>	R	S	W	L	G	L	R	F	L	R	A	L	R	L	I	Q	F	S	E	I	L	Q	F	L	N	I	L	K	T	
<i>dSlo</i>	R	T	W	I	G	L	R	F	L	R	A	L	R	L	M	T	V	P	D	I	L	Q	Y	L	N	V	L	K	T	
<i>Shaker</i>	L	A	I	L	R	V	I	R	L	V	R	V	F	R	I	F	K	L	S	R	H	S	K	G	L	Q	I	L	G	R
<i>bRCNC</i>	Y	P	E	I	R	L	N	R	L	L	R	I	S	R	M	F	E	F	F	Q	R	T	E	T						
<i>Kat1</i>	L	G	F	R	I	L	S	M	L	R	L	W	R	L	R	R	V	S	S	L	F	A	R							

**Figura 6.** El segmento S4 está conservado en canales activados por nucleótidos cíclicos y en un canal rectificador de entrada.

Comparación de la región S4 de los canales  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  humano (*hSlo*) y de *Drosophila* (*dSlo*), con la región S4 de un canal de  $K^+$  dependiente del potencial (*Shaker*), de un canal activado por cGMP de bastón de bovino (*bRCNC*) y de un canal de  $K^+$  rectificador de entrada de planta (*Kat1*). Los residuos positivos conservados se remarcan en fondo gris y con letra blanca. Note que el canal *bRCNC* tiene un residuo positivo conservado más que *hSlo*, sin embargo la dependencia del potencial de este canal es menor que la de los canales  $K_{Ca}$ . *Kat1* posee cinco residuos positivos, de los cuales uno no es conservado con respecto a los canales  $K_{Ca}$  y *Shaker*. Notablemente, al contrario de lo que sucede con los canales  $K_{Ca}$ , *Kat1* se activa con la hiperpolarización de la membrana (Figura modificada de Finn y col. 1996).

Como podemos ver, no se puede concluir *a priori* que la presencia de un segmento S4 con residuos básicos conservados conferirá al canal que lo posee una

dependencia del potencial como la que tienen otros canales cuyo segmento S4 es conservado. Esto es particularmente aplicable a los canales  $K_{Ca}$  en que se ha propuesto que la dependencia del potencial de la activación se origina en la unión de  $Ca^{2+}$ .

## 5.2 *Objetivos específicos.*

Específicamente se propuso alcanzar los siguientes objetivos:

- i. Caracterizar el proceso de inhibición de las corrientes macroscópicas, observado a potenciales  $\geq$  a 100 mV, con el fin de dilucidar si el proceso corresponde a una inactivación intrínseca del canal o a un bloqueo dependiente del potencial.
- ii. Determinar la dependencia del  $Ca^{2+}$  y del potencial del canal de  $K^+$  dependiente del  $Ca^{2+}$ , *hSlo*.
- iii. Determinar la dependencia del  $Ca^{2+}$  del parámetro  $V_0$ , con el objetivo de comprobar si el modelo de *activación iónica* (ver sección 5.2.1.2) describe correctamente la dependencia del potencial del canal *hSlo*. Si este modelo es correcto se espera que el  $V_0$  se relacione linealmente con el logaritmo de la  $[Ca^{2+}]$ , en cualquier intervalo de concentraciones.

- iv. Estudiar si el segmento S4 actúa como sensor del potencial en el canal *hSlo*, mediante mutagénesis puntual del dominio
  
- v. Caracterizar la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  y del potencial de los canales *hSlo* mutados en el segmento S4.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. *Biología molecular.*

#### 1.1. *Bacterias.*

##### 1.1.1. *Cepas bacterianas.*

Las cepas bacterianas usadas se eligieron de acuerdo a la compatibilidad con el vector usado. La cepa DH5 $\alpha$  se uso para amplificar las secuencias clonadas en los vectores de la serie pGEM (Promega Corp., Madison, WI USA), en cambio la cepa JM109 se usó para amplificar el vector *pALTER<sup>®</sup>-1* (Promega Corp., Madison, WI USA). La cepa BMH 71-18mutS se utilizó en una fase del procedimiento de mutagénesis *in vitro*, "*Altered Sites<sup>®</sup>*" (Promega Corp., Madison, WI USA). La cepa XL-1 Blue se usó para amplificar el plasmidio ZM4, derivado del vector pBS (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

##### 1.1.2. *Cultivo de bacterias.*

Los cultivos en medio líquido fueron crecidos a 225 ciclos/minuto, a 37 °C, en un agitador orbital. Se utilizó medio LB (Luria-Bertani) o Typ (Sambrook y col. 1989). Para los cultivos en medio sólido, se usó el medio líquido suplementado con

agar al 15% (Sambrook y col. 1989). Todos los medios fueron autoclavados a 125 °C, 15 psi.

#### 1.1.3. *Obtención de bacterias competentes.*

Para obtener bacterias competentes, se creció un cultivo en medio líquido hasta una densidad óptica (DO) de 0.2. Las bacterias se sedimentaron y resuspendieron en una solución estéril y fría de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, manteniéndolas en hielo por 30 min. Luego de una segunda sedimentación y resuspensión en la misma solución, las bacterias competentes se mantuvieron en hielo y se usaron dentro de 24 horas. Alternativamente se resuspendieron en una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol 15%, y se almacenaron a -80 °C.

#### 1.1.4. *Transformación de bacterias.*

Una alícuota de bacterias competentes se expuso a 0.015 volúmenes de DMSO o a β-mercapto etanol (22 mM final), durante 10 min., en hielo. Se añadió entonces 1 ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min antes de someter a las bacterias a un choque térmico de 42 °C durante 90 seg. Luego de transferirlas al hielo por 2 minutos, las bacterias se crecieron durante 45 min. en 5 ml de medio líquido sin antibiótico, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada en el plasmidio. El cultivo se transfirió a placas con medio sólido suplementadas con antibiótico, y se incubaron a 37 °C, durante 12 a 16 horas.

### 1.2. Antibióticos.

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

### 1.3. Obtención y purificación de DNA plasmidial.

El DNA plasmidial se purificó con las columnas para preparación de DNA "mini" "Qiagen" según las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA). Con el fin de aumentar el rendimiento de la preparación de los plasmidios portadores del cDNA *hSlo*, los cultivos fueron crecidos hasta una densidad óptica (DO) de 0.3 a 0.6. En este punto se añadió cloranfenicol ( $25\text{ a }100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ). La inhibición de la síntesis proteica en esta fase no impide que se alcance la saturación del cultivo, pero mejora el rendimiento de DNA plasmidial (Sambrook y col. 1989).

#### 1.4. Purificación de ácidos nucleicos en general.

La purificación de DNA sometido a digestión enzimática u otro tratamiento, u ocasionalmente del RNA transcrito *in vitro*, se efectuó mediante extracciones en un medio orgánico. La primera extracción se realizó con una mezcla que contenía fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), esta fue seguida por dos extracciones en cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con acetato de potasio (0.3 M) y 2,5 volúmenes de etanol. Luego de sedimentar los ácidos nucleicos en una minicentrífuga el precipitado se lavó dos veces con etanol 70%. La integridad del ácido nucleico se verificó en geles de agarosa (0.7% a 0.9%), teñidos con bromuro de etidio 0.66  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (a partir de una solución de 10 mg/ml) según el patrón de migración en relación a estándares de peso molecular y concentración conocidos. Una estimación preliminar de la concentración de las muestras se obtuvo también de estos geles. Para obtener las concentraciones finales deseadas el DNA y el RNA se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón Tris 10 mM-EDTA 1mM, pH 8 (TE) y en agua libre de RNAsas, respectivamente. La concentración fue chequeada por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV-120-12 (Shimadzu Corporation).

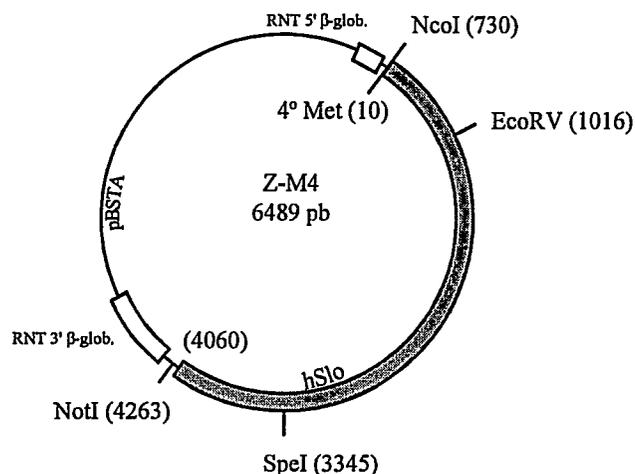
#### 1.5. Clones.

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron con la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , *hSlo*. Este canal fue clonado del miometrio

humano y la secuencia nucleotídica y la estructura primaria deducida se encuentran disponibles en GENBANK bajo el número de acceso U11058 (Wallner y col. 1995).

En los experimentos iniciales, los canales se expresaron a partir del clon pGhSlo411, que contiene el inserto codificante de *hSlo* clonado en el vector pGEM9Zf(-) (Promega Corp., Madison, WI USA). Al cDNA original se le removió una región no traducida (RNT) del extremo 5' que contiene dos secuencias de consenso Kozak (Kozak, 1987), correspondientes a las primeras dos metioninas codificadas en el cDNA (M1 y M2), y una región rica en nucleótidos GC (Wallner y col. 1995). Por lo tanto, la secuencia de inicio de traducción usada en este vector corresponde al tercer consenso de Kozak presente en el DNA clonado y a la tercera metionina codificada en el mismo (Wallner y col. 1995). Este cDNA conserva una RNT del extremo 5', compuesta de 86 pares de bases (pb) ubicadas inmediatamente río arriba de la tercera metionina partidora.

Posteriormente se utilizó el clon M3, cuyo principal ventaja es el alto nivel de expresión de corrientes *hSlo* que se logra en oocitos de *Xenopus laevis* (Stefani y col. 1997). Este vector fue construido insertando una secuencia de 223 pb de la RNT del extremo 5' de *Shaker* H4 en el extremo 5' de la secuencia codificante *hSlo*, y una región poli-A en el extremo 3' de *hSlo* (Stefani y col. 1997). Por último, el vector ZM4 (Fig. 7), que produce los niveles más altos de expresión de *hSlo*, fue construido con una secuencia de *hSlo* cuyo inicio se encuentra en la cuarta metionina presente en la secuencia (M4). Esta secuencia fue subclonada en una versión modificada del vector



**Figura 7.** Mapa del vector de alta expresión Z-M4.

La secuencia codificante *hSlo* a partir de la cuarta metionina (décimo residuo en la secuencia M3) se subclonó en los sitios de restricción *NcoI* y *NotI*, ubicados entre las regiones no traducidas (RNT) 5' y 3' de la  $\beta$ -globina de *Xenopus l.* El vector receptor (pBSTA) es una modificación del plasmidio pBS. El tamaño final de Z-M4 es 6489 pares de bases (pb).

pBS (Stratagene, La Jolla, CA, USA), entre las regiones 5' y 3' no traducidas de la  $\beta$ -globina de *Xenopus laevis*. Este vector contiene además una cola de poliadeninas (poliA).

#### 1.5.1. Subclonamiento de *hSlo* en el vector de mutagénesis *pALTER*<sup>®</sup>1.

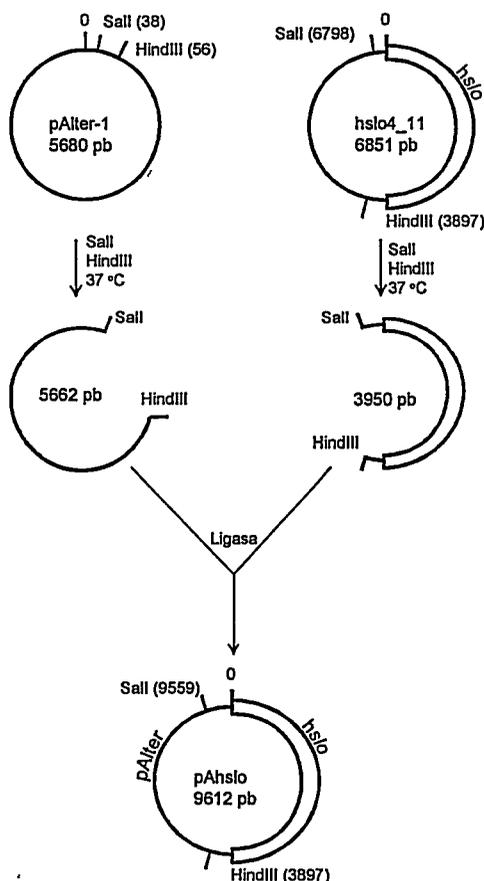
La secuencia *hSlo* fue subclonada en el vector *pALTER*<sup>®</sup>1 para realizar mutagénesis dirigida del segmento S4. El fragmento codificante *hSlo* se insertó entre los sitios *SalI* y *HindIII* de la región de clonamiento múltiple del vector *pALTER*<sup>®</sup>1 (Promega Corp., Madison, WI USA), para originar el vector *pAhSlo*. Con este fin, el plasmidio receptor *pALTER*<sup>®</sup>1 fue digerido en forma consecutiva con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*; el vector dador, *pGhSlo411* fue digerido con las mismas enzimas, para generar el fragmento codificante *SalI/HindIII* (Fig. 8). Los fragmentos

de interés se recuperaron al escindir las bandas de peso molecular adecuado, a partir de geles preparativos de agarosa de 0.7%, y se purificaron usando el “kit” extracción de DNA desde geles “QIAEX” (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA 91311, USA). Posteriormente, los fragmentos se ligaron para generar el vector *pAhSlo*, de 9612 pb (Fig. 8). La presencia del fragmento fue verificada mediante los siguientes criterios: **i.** según el patrón de migración del DNA en geles de agarosa, **ii.** por la recuperación del fragmento *Sall/HindIII* a partir de la digestión del vector *pAhSlo* con las mismas enzimas, **iii.** por hibridación de una sonda de *hSlo* a colonias bacterianas transformadas con el producto de la ligación, y **iii.** por ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las bacterias transformadas con *pAhSlo*. La región de policlonamiento de *pALTER<sup>®-1</sup>* se ubica inmersa en el gen *lacZ*, por lo tanto el vector *pALTER<sup>®-1</sup>* silvestre es capaz de conferir actividad  $\beta$ -galactosidasa a las bacterias que lo portan, las que en presencia de un sustrato adecuado, generan un producto coloreado. Cuando se inserta un fragmento en la región de clonamiento el gen *lacZ* se destruye, y por lo tanto las bacterias que lo portan no poseen la actividad mencionada.

#### 1.6. Mutagénesis.

La mutagénesis puntual del cDNA *hSlo* se realizó con el procedimiento de mutagénesis *in vitro* “Altered Sites<sup>®</sup>” (Promega Corp., Madison, WI USA), que usa el vector de mutagénesis “*pALTER<sup>®-1</sup>*”, o con el procedimiento de mutagénesis mediante

la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"; Horton y col. 1989; Landt y col. 1990). La presencia de las mutaciones fue verificada por secuenciación del DNA.



**Figura 8.** Subclonamiento de *hSlo* en el fagémido *pAlter-1*. El fragmento codificante del canal *hSlo* (de 3950 pares de bases (pb)) se obtuvo al digerir *hSlo4\_11* con las enzimas *Sall* y *HindIII*. Este inserto se ligó al fragmento de 5662 pb obtenido al digerir con las mismas el vector *pAlter-1*. El vector resultante, *pAhSlo* tiene un tamaño de 9612 pb.

### 1.6.1. Sistema de mutagénesis *Altered Sites*®.

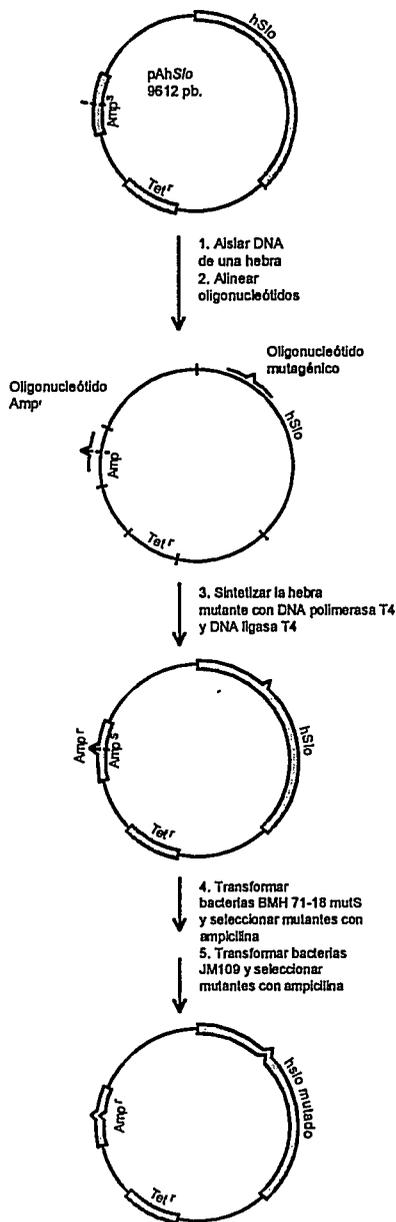
El sistema de mutagénesis *Altered Sites*®, ocupa un vector fagémido especializado para mutagénesis llamado *pALTER*®-1. Este vector posee un gen de resistencia a tetraciclina (*Tet*<sup>r</sup>) y un gen de resistencia a ampicilina, que se encuentra inactivo debido a una mutación puntual en él (*Amp*<sup>s</sup>). El vector *pAhSlo* se usó como el

vector de partida para la mutagénesis de *hSlo*. El método se basa en la capacidad del fagémido *pALTER*<sup>®</sup>-1 de generar partículas virales cuyo DNA es de una hebra cuando las bacterias transformadas se infectan con un bacteriófago ayudador. El fago ayudador aporta los genes que codifican para las proteínas de la cápsula viral, y las proteínas que activan el ciclo viral induciendo el encapsulamiento en forma de virus de DNA de hebra simple. De este modo, al infectar bacterias transformadas con el vector *pAhSlo* con el fago helper R801 es posible purificar del medio de cultivo, partículas virales del fagémido *pAhSlo*. El DNA de una hebra se recupera a partir de los virus presentes en el medio de cultivo bacteriano. Una vez purificado, el DNA se desnaturaliza y se incuba simultáneamente con el oligonucleótido mutagénico y con un oligonucleótido de reparación del gen de resistencia a ampicilina (Fig. 9). En una reacción *in vitro* se sintetiza la hebra complementaria que contiene la mutación deseada en el inserto codificante como también el gen reparado de resistencia a la ampicilina. El producto de esta reacción se usa para transformar bacterias de la cepa BMH 71-18mutS, que es incapaz de reparar el mal apareamiento de la hebra de DNA silvestre con la hebra mutada. El DNA generado se usa para transformar bacterias JM109. Los mutantes se seleccionan con ampicilina.

#### 1.6.2. Mutagénesis por PCR.

El procedimiento de mutagénesis por PCR está basado en la estrategia de “cuatro partidores” y es una modificación de los métodos descritos por Horton y col.

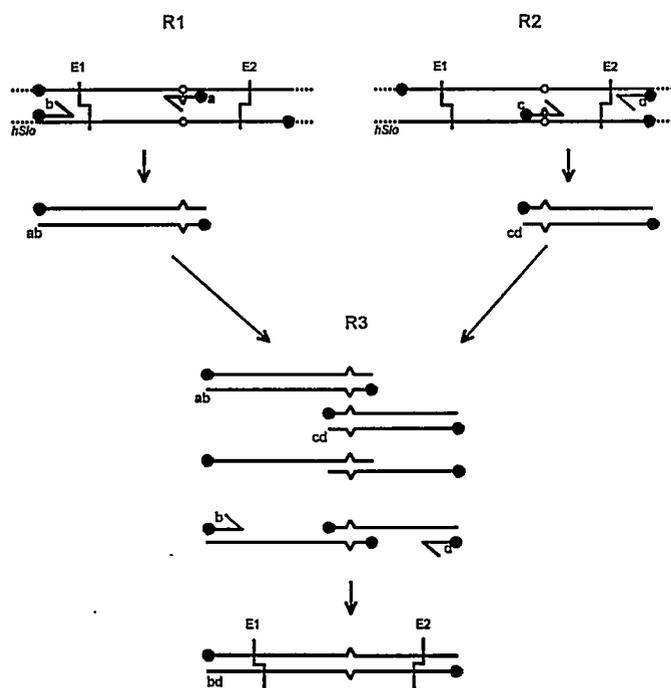
(1989) y Landt y col. (1990). Un requisito del método es la presencia de dos sitios únicos de restricción que flanqueen la zona que se desea mutagenizar.



**Figura 9.** Esquema del procedimiento de mutagénesis *in vitro* "Altered sites". Las bacterias transformadas con el fagémido pAhSlo se infectan con el bacteriófago "helper" R801 para inducir la producción de partículas virales cuyo DNA es pAhSlo de una hebra. Sobre este DNA se alinean los oligonucleótidos mutagénico y de reparación de la resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>). La síntesis de la hebra complementaria que contiene ambas mutaciones se realiza con DNA polimerasa T7. El DNA final se obtiene luego de transformar bacterias y seleccionar los mutantes con ampicilina.

Se efectúan dos reacciones paralelas de PCR cuyo templado es el DNA a mutagenizar. En la reacción 1 (R1) se usan como partidores un partidador mutagénico, a, y un partidador externo universal b, es decir distal a la mutación y a uno de los sitios

de restricción mencionados. En la reacción 2 (R2) se usa un partididor mutagénico, c, que es parcialmente complementario al partididor a, y un segundo partididor externo universal, d. Los fragmentos generados en las reacciones 1 y 2, ab y cd, respectivamente, contienen la mutación en ambas hebras, y se sobreponen parcialmente en los extremos que poseen la mutación. Estos fragmentos se purifican y se extienden en una tercera reacción de PCR (R3) en presencia de los partididores externos b y d. El fragmento generado, bd está limitado por los extremos 5' de los partididores b y d, y posee la mutación en ambas hebras (Fig. 10). Este fragmento se digirió con EcoRV y EcoRI y se subclonó como un "cassette" en el cDNA *hSlo* silvestre, previamente tratado con las mismas enzimas de restricción.



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

El sitio a mutagenizar en el DNA templado (*hSlo*) se esquematiza con un círculo vacío. Este sitio está flanqueado por dos sitios de restricción únicos (E1 y E2). En una reacción (R1) el DNA templado se alinea con los oligonucleótidos a y b, y en la segunda reacción (R2) se alinea con los oligonucleótidos b y c. Los fragmentos de PCR ab y cd se usan como DNA templado en la reacción R3, en conjunto con los partididores externos b y d. Los hebras simples de los fragmentos ab y cd se sobreponen según se

indica en R3. Los partididores b y d generan el fragmento de interés bd, que contiene la mutación en ambas hebras.

### 1.7. Secuenciación del DNA.

El DNA fue secuenciado usando el "kit" de secuenciación Sequenase Ver. 2.0 (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL 60005, USA) basado en el método de "terminación de la cadena por dideoxinucleótidos" (Sambrook y col. 1989). La cromatografía del DNA marcado con dATP- $\alpha^{32}$ S (NEN, Boston, MA 02118, USA) se realizó en geles de poliacrilamida al 6%. Los geles fueron lavados y deshidratados con una solución de ácido acético 5% y metanol 15%, y posteriormente secados. La detección de las bandas de DNA se hizo por autoradiografía.

### 1.8. Transcripción *in vitro*.

La transcripción se realizó usando como templado un DNA plasmidial previamente linearizado, en un sitio único (NotI o HindIII) ubicado inmediatamente río abajo de las secuencias 3' no traducidas (secuencia poliA o RNT 3' de la  $\beta$ -globina de *Xenopus laevis*) o de la secuencia codificante en el caso que el plasmidio no tuviera estas secuencias. La purificación del DNA linearizado y toda su manipulación posterior se hizo en medios libres de RNAsas. La linearización se verificó en un gel de agarosa al 0.7%.

La reacción de transcripción se efectuó empleando el "kit" mMMESSAGE mMACHINE (Ambion Inc., Austin, TX USA). La síntesis se dirigió desde el promotor T7 y se hizo en presencia de G(5')ppp(5')G, un análogo del nucleótido de modificación en 5' (7-metil guanosina, "cap"). La reacción de transcripción se detuvo

removiendo el DNA templado con DNAsa I libre de RNAsa, o añadiendo medio volumen de una solución de precipitación de RNA (LiCl 7.5 M, EDTA 75 mM). La mezcla se enfrió a -20 °C por una hora, y se sedimentó a máxima velocidad por 20 min en una minicentrífuga. El sedimento de RNA se lavó en etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsa. La integridad del transcrito se verificó en un gel de agarosa al 0.7% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

## 2. Ranas, oocitos y microinyección.

### 2.1. Ranas.

Grupos de 7 a 15 ejemplares hembras de la especie *Xenopus laevis* se mantuvieron en bateas plásticas con 15 a 20 litros de agua potable sin cloro, a una temperatura máxima de 20 °C y en obscuridad continua. El cloro del agua potable se extrajo almacenándola en toneles de 100 litros y burbujeando aire durante dos a tres días. Las ranas fueron alimentadas dos veces a la semana con alimento para anfibios.

### 2.2. Oocitos.

Los ejemplares de *Xenopus laevis* se anestesiaron por inmersión en una mezcla de agua y hielo durante 30 a 60 minutos. Mediante una incisión abdominal se disecaron uno o dos lóbulos ováricos y se transfirieron a solución OR-2. Esta solución está compuesta por: NaCl 82,5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH

7,6. La incisión fue suturada y el ejemplar devuelto a la mezcla de agua y hielo para su recuperación gradual. Con el fin de desfolicular y aislar los oocitos, los lóbulos se cortaron en trozos pequeños y se incubaron en medio OR-2 con 2.5 mg/ml de colagenasa (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD USA), equivalente a  $\approx$  450 U/ml, por un período de 60 a 90 minutos, a temperatura ambiente y con agitación orbital de 30 a 60 ciclos por minuto. Posteriormente, los oocitos se lavaron 5 veces en medio OR-2 sin colagenasa haciéndose a la vez una primera selección de oocitos de los estados V y VI. Los oocitos se transfirieron entonces a solución ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,6) suplementada con gentamicina (50  $\mu$ g/ml) y se mantuvieron a 18 °C.

### 2.3. Microinyección.

Doce a 24 horas después del tratamiento con colagenasa, se seleccionaron oocitos de los estados V y VI sin membrana folicular. Se microinyectó 50 nl de una solución de mRNA en agua (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l a 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, equivalentes a 2,5 ng y 25 ng, respectivamente) de la subunidad  $\alpha$  del canal K<sub>Ca</sub>, *hSlo* silvestre, o de alguno de los mutantes del segmento S4. La concentración del mRNA se escogió según el nivel de expresión de cada transcrito.

### 2.3.1. Procedimiento de microinyección.

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

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

### 3. Ensayo de unión de Iberiotoxina.

La iberiotoxina (IbTX) es una toxina peptídica que fue aislada del veneno del escorpión *Buthus tamulus* (Galvez y col. 1990) y tiene una alta afinidad y especificidad para los canales  $K_{Ca}$ . La toxina bloquea la corriente del canal con un mecanismo de reacción bimolecular (Candia y col. 1992; Giangiacomo y col. 1992). La toxina usada (gentilmente donada por la Dra. M. L. García; Merck Research Laboratories) es una versión mutada ( $[^{125}I]IbTX-D19Y/Y36F$ ) de la toxina silvestre con el fin de permitir su radioyodación sin inducir una pérdida de la actividad biológica (Koschak y col. 1997). Estos autores demostraron que la afinidad y la cinética de la interacción de los canales  $K_{Ca}$  con la toxina mutante yodada o sin yodar era igual a la de la toxina silvestre. La actividad específica de la toxina usada es constante, pues cuando se produce una desintegración la molécula pierde su capacidad de unirse al canal.

La actividad específica de la  $[^{125}I]IbTX-D19Y/Y36F$  fue de 2.178 Ci / mmol. La concentración de la toxina se determinó en forma previa al ensayo de unión, midiendo una alícuota de 2  $\mu$ l de la toxina marcada. La concentración de la toxina fue  $1,065 \cdot 10^{-9}$  M.

#### 3.1. Medición de la densidad de canales usando iberiotoxina

Con el objeto de estimar el número de canales presentes en la membrana, los oocitos se incubaron con IbTX en solución A, compuesta de ND96, gentamicina (50  $\mu$ g/ml) y BSA 0,1%.

El volumen de incubación fue de 5  $\mu\text{l}$  por oocito , y consistió en 4  $\mu\text{l}$  de solución A 1,25x, (concentrada 1,25 veces en relación a la concentración final), con el fin de compensar la dilución sufrida al añadir el volumen de 1  $\mu\text{l}$  de IbTX  $^{-125}\text{I}$  (1 nM). La composición de la solución A (1,25x) fue: ND96 (1,25x), BSA 0.125% (1,25x) y gentamicina (1,25x). La concentración final de IbTX fue de 200 pM, concentración 10 veces mayor que la constante de disociación de la toxina en baja fuerza iónica, ( $K_D$  IbTX =  $20 \cdot 10^{-12}$  M, en  $\text{Na}^+$  10 mM, Tris 20 mM, pH 7.4; Koschak y col. 1997). Sin embargo, la afinidad de la IbTX decrece con la fuerza iónica; específicamente el  $\text{Na}^+$ , cuya concentración en el medio de incubación es = 96 mM, inhibe la unión de  $^{125}\text{I}$ IbTX-D19Y/Y36F con una constante de inhibición de 28 mM y un número de Hill de 1 (Koschak y col. 1997). Para estimar la fracción de canales unidos a IbTX ( $f_{T-C}$ ), se supuso una competencia del  $\text{Na}^+$  y la IbTX por el sitio en el canal. De esta manera se puede calcular el límite inferior de  $f_{T-C}$  pues la unión de un ion  $\text{Na}^+$  al canal lo imposibilita totalmente de unir toxina.  $f_{T-C}$  fue calculado con la ecuación de Gaddum (ver apéndice III):

$$f_{T-C} = 1 / \{1 + K_D / [T]_L \cdot (1 + [\text{Na}^+] / K_I)\} \quad (9)$$

donde  $K_D$  y  $K_I$  son las constantes de disociación de la IbTX y del  $\text{Na}^+$  al canal, respectivamente,  $[T]_L$  es la concentración de IbTX libre en equilibrio y  $[\text{Na}^+]$  es la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio.

Los oocitos se incubaron 12 horas con la toxina, dado que el equilibrio de la unión se alcanza luego de 12 a 18 horas de incubación (comunicación personal, C. Vergara; Koschak y col. 1997).

La toxina no unida se lavó con el siguiente procedimiento:

- i. Dilución de 40 veces del volumen de incubación (5  $\mu$ l a 200  $\mu$ l).
- ii. Traspaso y lavado de cada oocito a un tubo con 100  $\mu$ l de solución A (sin IbTX.)
- iii. Repetición del paso ii. 3 veces. En cada lavado el oocito se dejó en el tubo durante el tiempo que tomó hacer el traspaso de toda la serie de oocitos incubados ( $\approx$  10 min.). Como la disociación de la toxina es lenta ( $t_{1/2} \approx$  8 horas; Koschak y col. 1997) la toxina unida a los canales *hSlo* no alcanza a disociarse en este lapso.
- iv. Traspaso de cada oocito al tubo de medición, que contiene 100  $\mu$ l de ND96.

### 3.2. *Conteo de la toxina radioactiva, [<sup>125</sup>I]-IbTX-D19Y/Y36F.*

La radioactividad de la [<sup>125</sup>I]IbTX-D19Y/Y36F se midió después del procedimiento de lavado, en un contador *gamma* (gentileza del Dr. Tulio Nuñez, Lab. De Membranas, Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile). La unión inespecífica se calculó a partir de la unión de la toxina a oocitos no inyectados.

### 4. *Registros electrofisiológicos.*

Los registros electrofisiológicos se realizaron usando la técnica de "*patch clamp*" (Hamill y cols 1981). La pipeta de registro se mantuvo adherida a la célula ("*cell-attached*") o se escindió de ella con la cara intracelular de la membrana hacia el baño ("*inside-out*"). Se registraron corrientes macroscópicas en macroparches de

membrana (Hilgemann, 1989) de oocitos de *Xenopus laevis*, inyectados 2 a 7 días antes con mRNA de *hSlo* silvestre o mutado en la región S4.

#### 4.1. Pipetas de registro.

Las pipetas se hicieron aplicando calor localizado a la zona central de un capilar de vidrio de borosilicato Pyrex (9530-1, Corning, Corning, NY USA) y tensión en los extremos del mismo. Las pipetas se estiraron en varios pasos, en un estirador horizontal de pipetas (Sutter Instrument Co., Novato, CA 94948 USA), o en dos pasos en un estirador vertical ("730", David Kopf Instruments, Tujunga CA USA). Las pipetas fueron pulidas a fuego en una microforja construida en el laboratorio, hasta obtener pipetas cuya punta tenía un diámetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . La resistencia de las pipetas osciló entre 1 a 2  $\text{M}\Omega$ , con las soluciones usadas. En forma excepcional se usaron pipetas con resistencias de hasta 5  $\text{M}\Omega$ , siempre y cuando la conductancia de la membrana no fuera mayor que 10 nS (ver sección 4.5: Resistencia en serie). Previamente a hacer el sello, la punta de la pipeta se cubrió con aceite mineral liviano (M-3516, Sigma Chemical Co. St Louis, MO USA) con el fin de incrementar la estabilidad del sello.

#### 4.2. Soluciones de registro.

Las pipetas de registro se llenaron con una solución de metanosulfonato de potasio (KMES) 110 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, HEPES 10 mM, pH 7 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  contaminante. El metanosulfonato (MES) se usó como anión no permeante para minimizar las corrientes de cloruro endógenas del oocito (Miledi 1982).

En los experimentos de bloqueo por  $\text{Ba}^{2+}$  interno de las corrientes macroscópicas *hSlo*, la solución de la cámara de registro, que en la configuración de parche escindido baña la cara intracelular de la membrana, contenía: KMES 110 mM, HEPES 10 mM, pH 7, y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  contaminante o  $\text{Ca}^{2+}$  añadido a las concentraciones indicadas. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en la solución del baño se midió con un electrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  (WPI, Sarasota, FL USA).

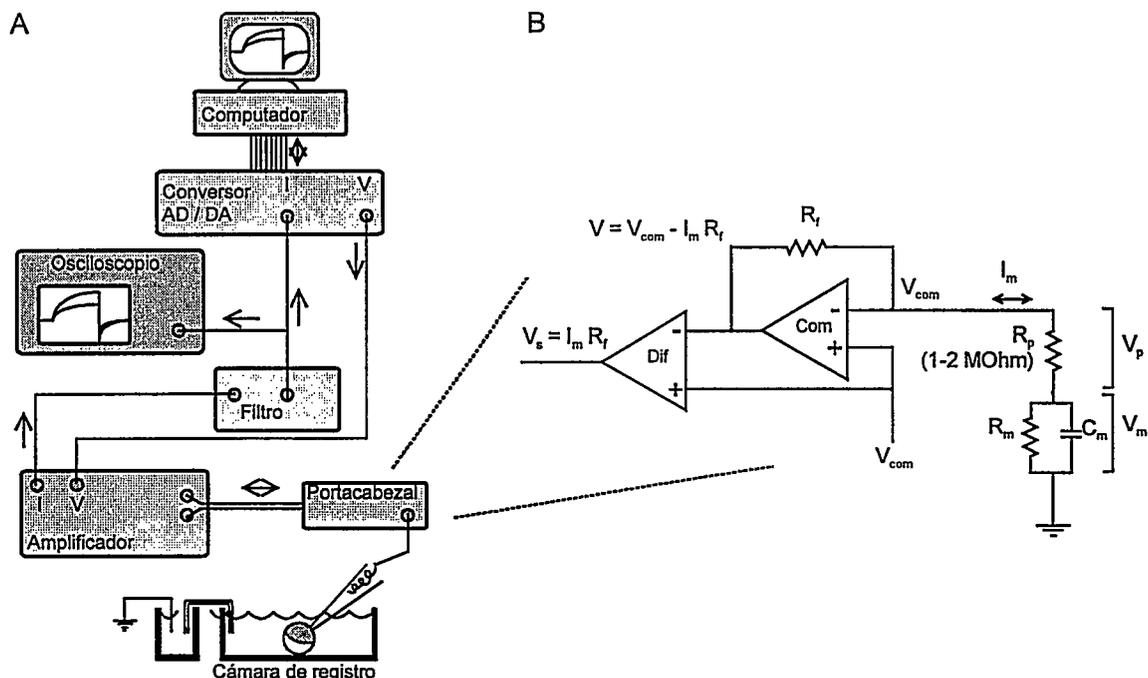
En los experimentos en que se midió la dependencia del potencial y del  $\text{Ca}^{2+}$  de la activación de las corrientes macroscópicas *hSlo*, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_L$ ) del baño se tamponó con los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  HEDTA, EGTA y EDTA. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  total añadido necesaria para obtener una  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  dada, se calculó con el programa CHELATOR (Schoenmakers y col. 1992). Todas las soluciones con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre entre 10 nM y 3 mM, contenían: KMES 110 mM, HEDTA 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7. La  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  deseada fue obtenida añadiendo alícuotas de  $\text{CaCl}_2$  concentrado. La  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  se midió con un electrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  (WPI, Sarasota, FL USA). Las soluciones cuya  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  fue menor de 10 nM, se obtuvieron reemplazando la cantidad correspondiente de MES con: HEDTA 10 mM ( $[\text{Ca}^{2+}]_L = 1.5$  nM), EGTA

10 mM ( $[Ca^{2+}]_L = 363$  pM), HEDTA 70 mM ( $[Ca^{2+}]_L = 217$  pM), EDTA 10 mM ( $[Ca^{2+}]_L = 55$  pM), EGTA 70 mM ( $[Ca^{2+}]_L = 52$  pM), EDTA 70 mM ( $[Ca^{2+}]_L = 8$  pM).

#### 4.3. Sistema de registro de las corrientes macroscópicas.

El sistema de registro utilizado se compone de los siguientes elementos (Fig. 11A): una cámara de registro fabricada en el laboratorio, un porta cabezal o "headstage" (que contiene el amplificador convertidor de corriente a voltaje como también los componentes necesarios para dar pulsos de comando al amplificador) el amplificador de "patch clamp", un osciloscopio de dos canales (5502, Hung Chang, Seoul, Korea), un filtro Bessel, pasa bajos (900, Frequency Devices, Haverhill, MA USA), una tarjeta análogo digital/digital análogo de 100 KHz (LabMaster TL-1, Scientific Solutions, Solon, Ohio USA), y un computador AT (Pentium 133 MHz). Durante el transcurso de la tesis se usó el amplificador EPC7 (List Medical, Darmstadt, Germany) y el amplificador Axopatch-1D con el portacabezal CV-4 (Axon Instruments, Foster City, CA USA).

La cámara de registro se montó sobre una mesa antivibratoria fabricada en el laboratorio y bajo una lupa binocular (PZM, WPI, Sarasota, FL USA) con un rango de



**Figura 11.** Esquema del sistema de registro y adquisición de corriente.

A. El esquema muestra los componentes usados en el registro y adquisición de la corriente iónica. Las flechas indican el sentido de las señales de corriente y voltaje. Los estímulos de voltaje (V) se generaron en el computador y a través del convertidor digital - analógico (DA) se tradujeron en una señal analógica capaz de ser usada por el amplificador de "patch". Las señales analógicas de corriente (I) fueron filtradas y digitalizadas con el convertidor analógico - digital (AD). Esta señal fue almacenada en línea en el disco duro del computador. B. Esquema del circuito básico de amplificadores contenidos en el portacabezal y del circuito equivalente formado por la pipeta y la membrana. El amplificador de comando (Com) es alimentado con el potencial de comando ( $V_{com}$ ). Para mantener el potencial de la membrana igual a  $V_{com}$ , el amplificador entrega una corriente igual a la que circula por la membrana ( $I_m$ ) a través de la resistencia de "feedback" ( $R_f$ ). El voltaje a la salida de este amplificador es  $V = V_{com} - I_m \cdot R_f$ . El amplificador diferencial (Dif) hace la diferencia entre V y  $V_{com}$  y por lo tanto el potencial a la salida es  $V_s = I_m \cdot R_f$ . Se indica además la resistencia de la pipeta ( $R_p$ ) y la resistencia y la capacidad de la membrana ( $R_m$  y  $C_m$ ), como así también la caída de potencial en la pipeta ( $V_p$ ) y en la membrana ( $V_m$ ).

magnificación de 14 a 80 veces. La visualización del oocito en la cámara fue facilitada por una fuente de luz con fibra óptica (FiberLite 180, Dolan Jener Industries Inc. Lawrence, MA USA). La cámara de registro, de 200  $\mu$ l, se equipó con un sistema de

capilares plásticos que permite introducir y retirar soluciones por diferencia presión. El medio se cambió haciendo fluir 5 a 8 volúmenes de solución a través de la de cámara. Cuando se intercambiaron soluciones con distintas  $[Ca^{2+}]$ , se observó que con los primeros dos volúmenes se alcanzaba el cambio máximo en la activación de las corrientes *hSlo*, detectadas con un pulso de 10 mV, a una frecuencia de 0,5 Hz.

La posición y el desplazamiento de la pipeta de registro se controló con un micromanipulador compuesto por tres plataformas con tornillo micrométrico (420, Newport Corporation, Fountain Valley, CA USA) con desplazamiento en los ejes X e Y en el plano horizontal y con desplazamiento en el eje Z desviado  $45^\circ$  en relación al plano vertical. El desplazamiento en este eje se pudo controlar manualmente o con un motor (860, Newport Corporation, Fountain Valley, CA USA) con controlador gradual de velocidad ("Joystick", 860-J, Newport Corporation, Fountain Valley, CA USA).

#### 4.4. Procedimiento de registro de las corrientes macroscópicas.

La membrana vitelina del oocito se removió manualmente en la cámara de registro. La pipeta de registro se introdujo a la cámara y la solución del baño se cambió para evitar la contaminación con  $Ca^{2+}$ . Antes de hacer el sello se canceló la diferencia de potencial entre el electrodo de registro y el electrodo de referencia. Ambos electrodos se fabricaron con alambre de plata recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl). El recubrimiento se hizo sumergiendo el alambre de Ag en solución de hipoclorito de sodio. Los sellos se hicieron acercando la pipeta de registro a la

superficie del oocito midiendo simultáneamente la corriente que fluye por la pipeta inducida por un pulso de 10 mV y 2 ms. Cuando se produce un aumento de la resistencia en la punta de la pipeta, debido al contacto inicial de la misma con el oocito, se detiene el acercamiento de la pipeta y se aplica un vacío leve al interior de la misma. Esto produce un contacto íntimo entre la membrana del oocito y el borde de la punta de la pipeta, formándose un sello de alta resistencia eléctrica ( $\geq 1 \text{ G}\Omega$ ). Si la pipeta no se mueve adicionalmente, el sello es "adherido a la célula" ("cell-attached"). Para escindir el sello dejando la cara interna de la membrana expuesta al baño ("inside out") la pipeta se desplazó rápidamente, alejándose del oocito.

#### 4.5. Resistencia en serie.

El sistema de registro de corriente utiliza un amplificador de "patch-clamp" (Fig. 11B). En este sistema el potencial de membrana ( $V_m$ ) se controla mediante el mismo electrodo que inyecta la corriente que circula a través de los canales presentes en la membrana ( $I_m$ ). En este sistema el potencial real de la membrana no puede medirse y se espera que sea igual al potencial de comando ( $V_{com}$ ). Sin embargo rigurosamente, el potencial de membrana es:

$$V_m = V_{com} - V_p \quad (10)$$

donde  $V_p$  es la caída de potencial a través de la pipeta. Esta caída de potencial es una consecuencia de la resistencia en serie existente en la interfase del microelectrodo con la solución de pipeta y en la punta de la pipeta. Así entonces, para que se cumpla que

$V_m$  sea igual a  $V_{com}$ ,  $V_p$  debe ser despreciable en relación a la caída de potencial a través de la membrana ( $V_m$ ). Esta condición se cumple solamente si la resistencia de pipeta ( $R_p$ ) es despreciable en relación a la resistencia de membrana ( $R_m$ ), pues dada la naturaleza del circuito tenemos:

$$V_p = I_m \cdot R_p \quad (11a)$$

$$V_m = I_m \cdot R_m \quad (11b)$$

y al hacer la razón de ambas ecuaciones resulta:

$$V_p / V_m = R_p / R_m \quad (12)$$

Para lograr que esta razón sea baja, se debe trabajar con pipetas de baja resistencia en relación a la resistencia de la membrana, o en otras palabras la conductancia de la membrana debe ser baja. De este modo, se utilizaron pipetas cuya resistencia ( $R_p$ ) fue de  $1 \text{ M}\Omega$  y parches de membrana con corrientes de alrededor de  $5 \text{ nA}$ , a  $100 \text{ mV}$ . Esto corresponde a una conductancia de membrana de  $5 \cdot 10^{-8} \text{ S}$ , o a una  $R_m$  de  $20 \text{ M}\Omega$ . En estas condiciones  $V_p / V_m = 1 / 20$ , y por lo tanto  $V_m \approx 0,95 \cdot V_{com}$ , lo que implica un error de un 5% en  $V_m$  respecto al potencial aplicado. Este error introducido por la resistencia en serie no fue corregido.

##### 5. Adquisición y análisis de los datos electrofisiológicos.

Las corrientes *hSlo* se indujeron estimulando el parche de membrana con pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y de duración adecuada para alcanzar el estado estacionario de las corrientes. Alternativamente, la membrana se

estimuló con una rampa de potencial lo suficientemente lenta como para registrar corrientes en pseudo estado estacionario. Esta condición fue comprobada estimulando con un pulso triangular de voltaje cuya magnitud fue igual a la de la rampa, y de duración variable. Se consideró que la corriente estaba en pseudo estado estacionario cuando la fase ascendente del pulso triangular de potencial indujo una corriente que visualmente era la imagen especular de la corriente inducida por la fase descendente del pulso triangular.

La señal de corriente se filtró a una frecuencia 5 veces menor que la frecuencia de muestreo del convertidor análogo digital (ADC) y se adquirió con el programa pClamp 5.51 (Axon Instrument, Inc.).

El análisis básico de los datos, que incluyó la corrección de la línea base de los registros de corriente y la construcción de las curvas de corriente en estado estacionario en función del potencial de membrana (curvas  $I_{ee}$ -V) se hizo con el programa pClamp 6.0 (Axon Instrument, Inc.). Con los datos de  $I_{ee}$ -V se generaron archivos ASCII de dos columnas que se procesaron posteriormente con la planilla de cálculo Microsoft Excel V7.0 (Microsoft Corporation).

### 5.1. Estimación del bloqueo por $Ba^{2+}$ .

La cinética del bloqueo de los canales  $K_{Ca}$  por el  $Ba^{2+}$  presente en la cara interna de la membrana, es lenta (Vergara y Latorre 1982). Para observar el bloqueo inducido por el  $Ba^{2+}$  contaminante de las corrientes  $hSlo$ , fue necesario dar pulsos de

potencial de hasta 150 mV y de 1 segundo de duración. Para evitar acumulación del bloqueo, los pulsos de potencial en el intervalo de 100 mV a 150 mV se separaron por intervalos de un minuto.

### 5.2. Estimación del número equivalente de cargas de compuerta ( $z_{eq}$ ).

Para obtener un valor confiable del número equivalente de cargas de compuerta,  $z_{eq}$ , se debe determinar la conductancia máxima,  $G_{max}$ , del parche de membrana del cual se está registrando. Con este fin, la membrana se estimuló con pulsos rectangulares de potencial y se hicieron curvas Iee-V. Las curvas de conductancia,  $G$ , en función del potencial de membrana,  $V$ , (curvas G-V) se obtuvieron con la relación:

$$G = I / (V - E_K) \quad (13)$$

donde  $I$  es la corriente de  $K^+$  medida y  $E_K$  es el potencial de equilibrio del potasio. La  $G_{max}$  se determinó ajustando una distribución de Boltzmann a las curvas G-V en un intervalo apropiado de  $[Ca^{2+}]$ :

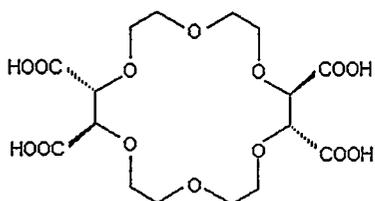
$$P_o = G / G_{max} = [1 + \exp(-z_{eq} \cdot F \cdot (V_{1/2} - V) / (R \cdot T))]^{-1} \quad (14)$$

donde  $z_{eq}$  es el número equivalente de cargas de compuerta,  $V_{1/2}$  es el voltaje en cual se alcanza el 50% de la  $G_{max}$ ,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. Una vez que  $G_{max}$  fue encontrado, se usó ese valor para ajustar todas las curvas  $P_o$ -V (curvas de conductancia normalizada en función del potencial) en el intervalo de  $[Ca^{2+}]$  probadas para dicho parche de membrana.

Los canales  $K_{Ca}$  nativos y clonados son bloqueados por el  $Ca^{2+}$  interno; adicionalmente, la conductancia del canal único se satura a potenciales  $\geq 120$  mV (Oberhauser y col. 1988; Cox y col. 1997a). El bloqueo por  $Ca^{2+}$  es dependiente del potencial y aumenta cuando el potencial se despolariza. Estos fenómenos inducen una no linealidad en las curvas de corriente en estado estacionario en función del potencial, que debe ser tomada en cuenta en la estimación de las curvas G-V, pues puede introducir un error en la determinación de la  $G_{max}$ . Este error se produce cuando en presencia de  $[Ca^{2+}]$  bajas es necesario aplicar voltajes despolarizantes  $\geq 120$  mV para activar los canales o cuando la  $[Ca^{2+}]$  está en el intervalo milimolar, induciendo el bloqueo de los canales a potenciales menores que el valor indicado. En presencia del bloqueo por  $Ca^{2+}$ ,  $G_{max}$  será subestimada y  $z_{eq}$  será sobreestimada. Como el bloqueo por  $Ca^{2+}$  es rápido, no interfiere con la determinación de  $G_{max}$  a partir de las corrientes de cola, inducidas con potenciales negativos. Para comprobar que el valor de  $G_{max}$  estimado de las curvas I<sub>ee</sub>-V no estaba subestimado por el bloqueo por  $Ca^{2+}$ , se construyeron curvas G-V a partir de las corrientes de cola, en presencia de las mismas concentraciones de  $Ca^{2+}$  en que se determinó la  $G_{max}$  a partir de las curvas I<sub>ee</sub>-V. Las curvas G-V obtenidas de las colas confirmaron que los valores de  $G_{max}$  obtenidos de las curvas I<sub>ee</sub>-V, en el intervalo de potenciales de membrana y  $[Ca^{2+}]$  en que se estimó dicho parámetro, no estaban afectados por el bloqueo por  $Ca^{2+}$ .

### 6. Reactivos específicos.

El éter corona ácido (+)18-corona-6-tetracarboxílico (A18C6T; E. Merck, Darmstadt, Germany) fue donado gentilmente por el Dr. Jacques Neyton, y se usó como quelante de  $Ba^{2+}$ . Este compuesto también se conoce como ácido (+)-1,4,7,10,13,16-hexa-oxa-ciclooctadecano-2,3,11,12-tetracarboxílico;  $C_{16}H_{24}O_{14}$ , (Fig. 12). La estequiometría del complejo A18C6T/ $Ba^{2+}$  es 1:1 (ver resultados). El éter corona también une  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  con constantes de disociación de  $3.3 \cdot 10^{-6}$  M y  $10^{-8}$  M, respectivamente (Dietrich, 1985). El A18C6T se usó a partir de una solución concentrada en agua.



**Figura 12.** Estructura química del éter corona A18C6T. Estructura del ácido (+)-18-corona-6-tetracarboxílico (A18C6T), también denominado: ácido (2R,3R,11R,12R) -(+)-1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano-2,3,11,12-tetracarboxílico.

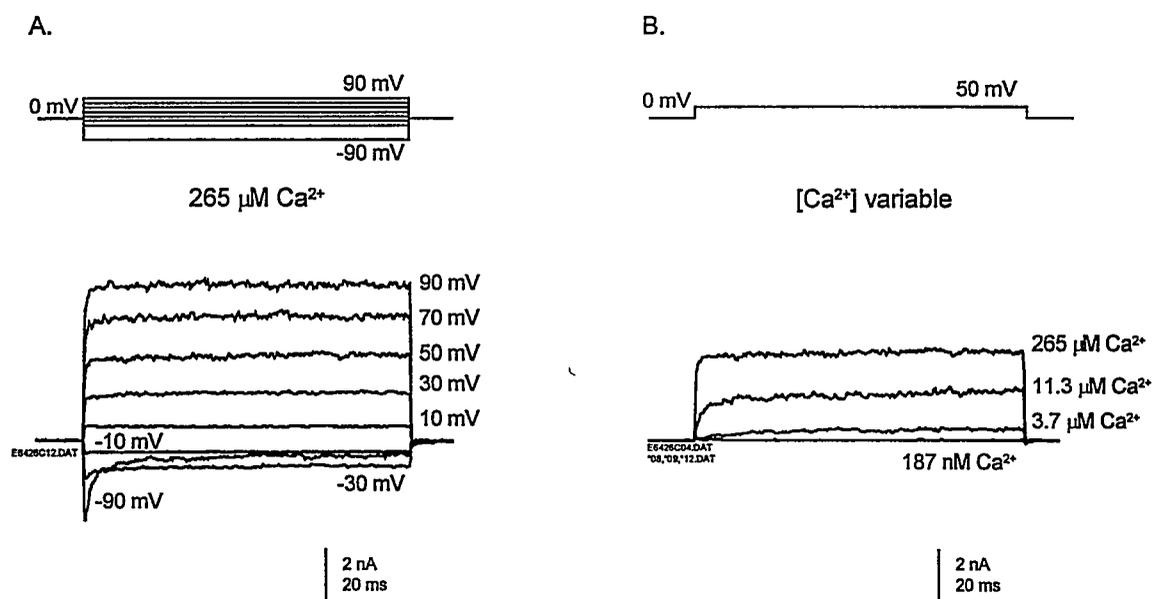
## RESULTADOS

1. *Los canales hSlo silvestres expresados en oocitos, son sensibles al  $Ca^{2+}$  y dependientes del potencial.*

La inyección del mRNA del canal  $K_{Ca}$  *hSlo* en oocitos de *Xenopus laevis*, tiene como resultado la expresión de corrientes de  $K^+$  que conservan las características de los canales  $K_{Ca}$  nativos. La figura 13 muestra que las corrientes macroscópicas *hSlo* son dependientes del potencial eléctrico transmembranal y del  $Ca^{2+}$  presente en el lado intracelular del canal. Como se observa en 13A, los pulsos a -90 mV y -30 mV, inducen corrientes de entrada que se relajan a un nivel estacionario de amplitud menor a la inicial. Dado que la  $[Ca^{2+}]$  en el lado intracelular del canal es 265  $\mu M$ , hay canales que al potencial de mantención (0 mV) están abiertos (ver Fig. 22, curva G-V a 265 $\mu M$ ). De esta manera, la corriente instantánea de entrada se debe al cambio en la fuerza electromotriz para el  $K^+$ . La relajación posterior es reflejo del cierre parcial de los canales a -30 mV y del cierre casi total de los canales a -90 mV. Por otro lado, los pulsos a potenciales positivos inducen una corriente instantánea de salida, que se relaja a un nivel estacionario de mayor amplitud, que refleja la apertura de una fracción de los canales que estaban cerrados a 0 mV. La sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de los canales *hSlo* se observa en la figura 13B. En esta se superpusieron cuatro registros de corrientes inducidas por un pulso de 50 mV, en un intervalo de  $[Ca^{2+}]$  de 187 nM a 265  $\mu M$ .

Con la  $[Ca^{2+}]$  más baja la corriente inducida es despreciable. Sin embargo, a medida que la  $[Ca^{2+}]$  en el lado intracelular de la membrana aumenta, la magnitud de la corriente inducida por el pulso de 50 mV y la rapidez con que alcanza el estado estacionario se incrementan. Es importante notar que en la escala temporal probada las corrientes son sostenidas, sin indicios de inactivación.

Así entonces, los canales *hSlo* expresados en oocitos de *Xenopus* conservan dos



**Figura 13.** Dependencia del voltaje y del  $\text{Ca}^{2+}$  de las corrientes hSlo expresadas en oocitos de *Xenopus laevis*.

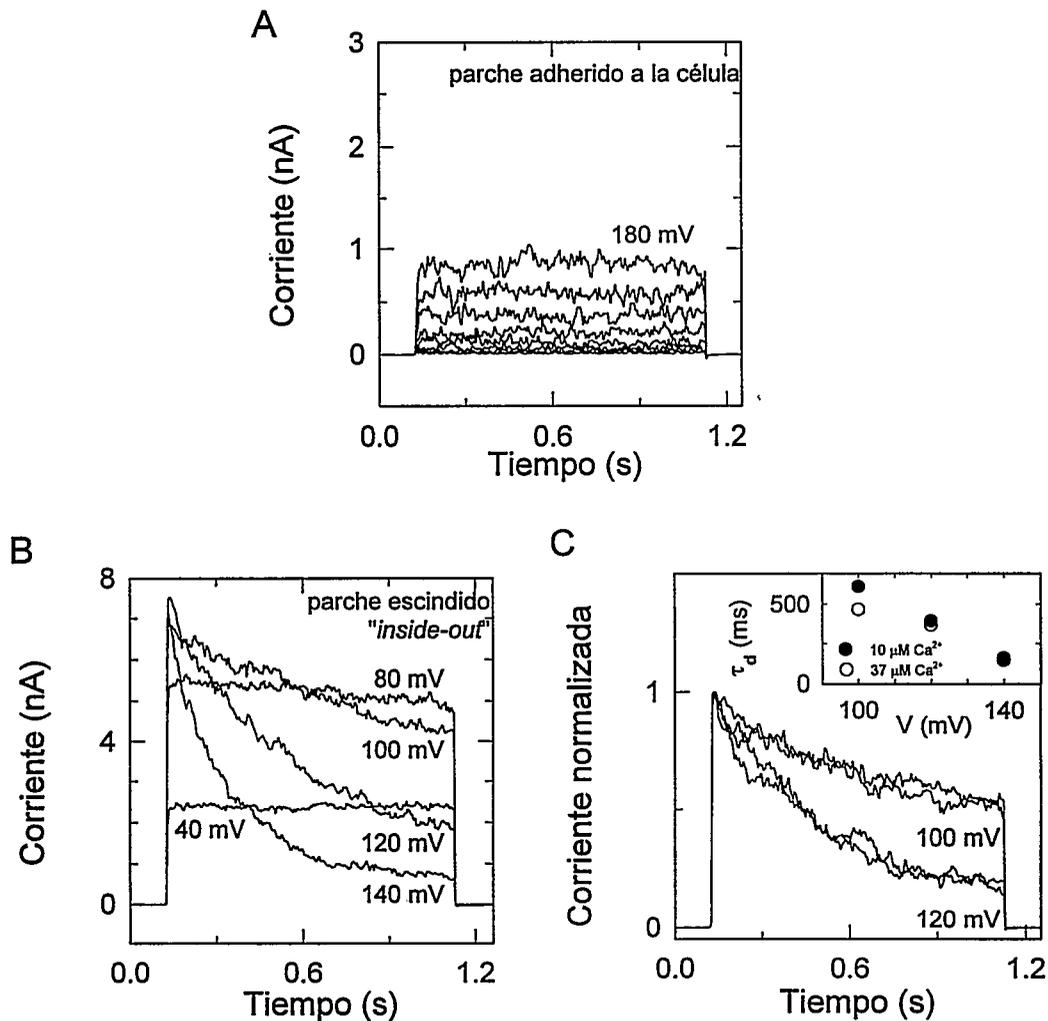
Familias de corrientes macroscópicas *hSlo* registradas de un mismo parche de membrana escindido con el interior hacia afuera. En A y B el potencial de mantención fue 0 mV y el protocolo de pulsos de voltaje usado se ilustra en la parte superior. La  $[\text{K}^+]$  fue 110 mM, simétrica. El  $\text{Ca}^{2+}$  se tamponó con HEDTA. **A.** Trazos superpuestos de corrientes inducidas por pulsos de potencial de la magnitud indicada junto a cada trazo. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  fue 265  $\mu\text{M}$ . **B.** Corrientes inducidas por un pulso de 50 mV. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el lado intracelular del canal (correspondiente al baño) se indica junto a cada trazo.

propiedades fundamentales de la activación de los canales  $K_{Ca}$ : la dependencia del potencial y la sensibilidad al  $Ca^{2+}$ . (Blatz y Magleby 1987; Latorre y col. 1989).

## 2. Las corrientes *hSlo* poseen un proceso de inhibición lento en parches escindidos.

En la figura 14A se observan corrientes *hSlo* típicas inducidas por pulsos de un segundo de duración, en un parche de membrana adherido a la célula. En esta configuración pulsos de potencial de hasta 180 mV y de esta duración, inducen corrientes que no se inactivan. Sin embargo, cuando el parche se escinde de la célula exponiendo la cara interna de la membrana al baño, los pulsos despolarizantes extremos ( $\geq 80$  mV) inducen una corriente que decae con el tiempo (Wallner y col. 1995; Tseng-Crank y col. 1994). Esta inhibición es apenas perceptible a 80 mV, pero a medida que el voltaje se incrementa, el decaimiento de la corriente se acelera y la amplitud en el estado estacionario disminuye (Fig. 14B).

El decaimiento de la corriente observado en parches escindidos, no se modifica al aumentar la  $[Ca^{2+}]$  desde 10  $\mu M$  a 37  $\mu M$ . El curso temporal del decaimiento de la corriente inducido por estímulos de 100 mV y 120 mV, fue el mismo en ambas concentraciones de  $Ca^{2+}$  interno (Fig. 14C). Esta relajación se pudo describir con una función exponencial con una constante de decaimiento  $\tau_D$ . En el recuadro de la misma figura se puede notar que las constantes de tiempo  $\tau_D$  son prácticamente indistinguibles en ambas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , lo que indica que el proceso no es dependiente de este catión.



**Figura 14.** Las corrientes macroscópicas *hSlo* presentan una inhibición lenta dependiente del potencial.

Los registros de corriente en A (parche adherido a la célula) y en B (lado interno hacia el baño) se obtuvieron del mismo parche. En todos los casos la  $[\text{K}^+]$  en la solución de la pipeta y del baño fue 110 mM y el potencial de mantención fue 0 mV. **A.** Registros típicos de corriente en un parche de membrana adherido a la célula. El parche se estimuló con pulsos de 1 s, entre 10 mV a 180 mV, con incrementos de 10 mV. Se muestran las corrientes correspondientes a los pulsos entre 110 mV y 180 mV. **B.** Corrientes inducidas por pulsos de voltaje de 1 s, en un parche escindido con el lado interno hacia el baño. Para los pulsos  $\geq 80$  mV el intervalo entre pulsos fue de 1 min con el fin de evitar la acumulación de la inhibición. **C.** Corrientes superpuestas obtenidas a dos  $[\text{Ca}^{2+}]$  (10  $\mu\text{M}$  y 37  $\mu\text{M}$ ) a los potenciales indicados. El recuadro muestra la constante de tiempo del decaimiento ( $\tau_d$ ) en función del potencial, para las dos  $[\text{Ca}^{2+}]$ .  $\tau_d$  se obtuvo ajustando una función exponencial a los trazos.

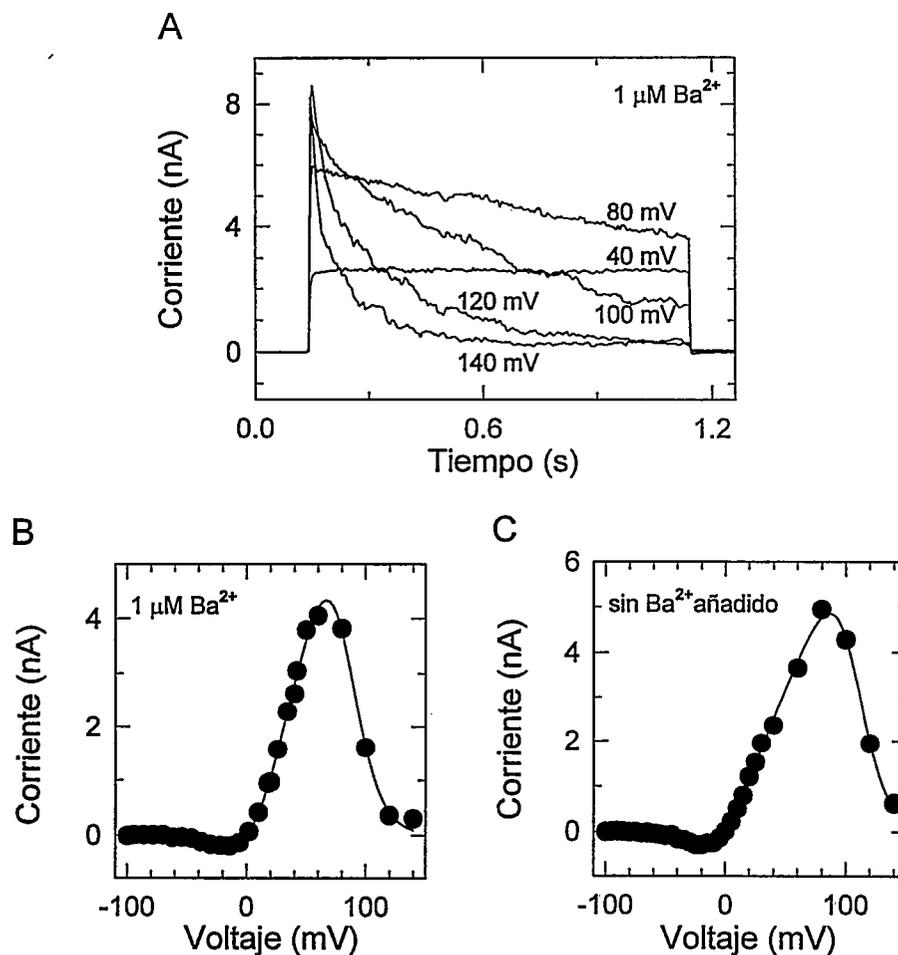
El proceso de inhibición descrito tiene similitudes con la inactivación que sufren los canales de  $K^+$  dependientes del potencial y los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de las células cromafines de rata,  $K_{Ca}$ i. Dado que la inhibición de *hSlo* es dependiente del potencial (Fig. 14B,C; ver Fig. 15C), el proceso podría corresponder a una inactivación de tipo N de los canales  $K_v$  (Hoshi y col. 1990) o del tipo  $K_{Ca}$ i de los canales  $K_{Ca}$  de células cromafines (Solaro y Lingle, 1992). Sin embargo, la cinética de la inhibición de los canales *hSlo* es demasiado lenta en relación a los procesos de inactivación mencionados, pareciéndose más a la cinética de la inactivación tipo C de los canales  $K_v$  (Hoshi y col. 1991). La inactivación tipo C es independiente del voltaje en el intervalo de -25 mV a 50 mV (Hoshi y col. 1991), lo que sugiere que la inhibición de *hSlo* es un fenómeno distinto a la inactivación del tipo C. Por otro lado, el decaimiento de la corriente hace recordar el bloqueo dependiente del potencial por bario interno, de los canales de  $K^+$  (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Brodwick, 1980). Debido a la similitud de este bloqueo con el proceso observado con *hSlo* y tomando en cuenta que los canales  $K_{Ca}$  son bloqueados por  $Ba^{2+}$  interno en forma dependiente del potencial (Vergara y Latorre, 1983; sección 4.4.1, Introducción), propusimos la hipótesis que el decaimiento de la corriente *hSlo* se debe a un bloqueo por  $Ba^{2+}$  presente en el medio interno. Aunque la inhibición se observa sin añadir  $Ba^{2+}$ , la solución del baño tendría una concentración efectiva de  $Ba^{2+}$  capaz de inducir un bloqueo de la corriente a potenciales  $\geq 100$  mV. Este bloqueo se manifiesta cuando al escindir el parche de membrana con la cara interna hacia afuera, el  $Ba^{2+}$  contaminante puede interactuar con los canales *hSlo*.

2.1. *El Ba<sup>2+</sup> interno induce un proceso de inhibición similar a aquel observado al escindir el parche de membrana.*

Para comprobar la hipótesis planteada, se observó el efecto inducido al añadir Ba<sup>2+</sup> 1 μM a la solución interna (Fig. 15A y B) y se comparó con la inhibición observada al escindir la membrana en soluciones sin Ba<sup>2+</sup> añadido (Fig. 14B y 15C). Las corrientes obtenidas en presencia de Ba<sup>2+</sup> 1 μM (Fig. 15A) son cualitativamente similares a las corrientes obtenidas en soluciones sin Ba<sup>2+</sup> agregado. Sin embargo, al añadir Ba<sup>2+</sup> se observan las siguientes diferencias: **a.** En presencia de Ba<sup>2+</sup> 1 μM la inhibición es evidente a 80 mV, y comparable a la observada con pulsos de 100 mV en la condición control (sin Ba<sup>2+</sup> añadido); **b.** Para cualquier voltaje dado, la velocidad de la inhibición es mayor en presencia de Ba<sup>2+</sup> 1 μM que cuando no se agrega esta catión. Las curvas de corriente en estado estacionario ( $I_{EE}$ ) en función del potencial, en ambas condiciones se ajustaron con una distribución de Boltzmann que describe la activación de la corriente, factorizada por una isoterma de Langmuir que describe la fracción de corriente bloqueada en función de la [Ba<sup>2+</sup>]:

$$I_{EE} = \{G_{max} \cdot (V - E_K) / [1 + \exp(-z_{eq} \cdot F \cdot (V - V_0) / (R \cdot T))]\} \cdot [(1 + [Ba^{2+}] / K_d(V))^{-1}] \quad (15)$$

En esta expresión  $G_{max}$  es la conductancia máxima,  $E_K$  es el potencial de equilibrio del K<sup>+</sup>,  $z_{eq}$  es el número equivalente de cargas de compuerta,  $T$  es la temperatura y  $F$  y  $R$  son las constantes de Faraday y de los gases, respectivamente;  $[Ba^{2+}]$  es la concentración de Ba<sup>2+</sup> interno y  $K_d(V)$  es la constante de disociación para la unión de



**Figura 15.** El  $\text{Ba}^{2+}$  interno induce una inhibición de las corrientes *hSlo* que es cualitativamente similar a la inhibición observada sin  $\text{Ba}^{2+}$  agregado.

**A.** Corrientes obtenidas al agregar  $\text{Ba}^{2+}$   $1 \mu\text{M}$  a la solución del baño (cara intracelular de la membrana). La magnitud de los estímulos de voltaje se indica junto a cada trazo. Se usaron las mismas condiciones detalladas en la figura 14. **B.** Curva de corriente en estado estacionario en función del potencial (curvas I<sub>ee</sub>-V), para los datos mostrados en A. La corriente se midió al final de cada pulso de voltaje. La línea continua es el ajuste de la ecuación 15 a los datos, con los siguientes parámetros:  $G_{max} = 82 \text{ nS}$ ,  $z_{eq} = 1,7$ ,  $V_0 = 11 \text{ mV}$ ,  $K_d(0) = 1,37 \text{ mM}$  y  $z\delta = 2,15$ . **C.** Curva I<sub>ee</sub>-V obtenida de los datos de la figura 14B, sin  $\text{Ba}^{2+}$  agregado. La línea continua es el ajuste de la ecuación 15 a los datos usando los parámetros  $K_d(0)$  ( $1,37 \text{ mM}$ ) y  $z\delta$  ( $2,15$ ) obtenidos de la figura 15B. Los parámetros ajustados fueron:  $G_{max} = 65 \text{ nS}$ ,  $z_{eq} = 2,0$ ,  $V_0 = -5 \text{ mV}$ , y  $[\text{Ba}^{2+}]$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  contaminante,  $= 144 \text{ nM}$ .

Ba<sup>2+</sup>. La ecuación 15 supone que la reacción de unión del Ba<sup>2+</sup> es bimolecular (Vergara y Latorre, 1983; Pérez y col. 1994) y que la constante de disociación para la unión del Ba<sup>2+</sup> es una función exponencial del voltaje según la ecuación 16 (Woodhull, 1973):

$$K_d(V) = K_d(0) \cdot \exp[-z \cdot \delta \cdot F \cdot V / (R \cdot T)] \quad (16)$$

donde  $K_d(0)$  es la constante de disociación para la unión del Ba<sup>2+</sup> a 0 mV,  $z$  es la valencia del ion bloqueador y  $\delta$  es la fracción del total del potencial eléctrico que cae entre la solución del lado interno, donde se encuentra el bloqueador, y el sitio de unión del Ba<sup>2+</sup>. Estas suposiciones se han usado en la descripción de la interacción del Ba<sup>2+</sup> con otros canales K<sub>Ca</sub> (Vergara y Latorre, 1983, Benham y col. 1985) y los resultados obtenidos indican que son apropiadas para *hSlo*.

El ajuste de la ecuación 15 a la curva  $I_{ee}$ -V obtenida con Ba<sup>2+</sup> 1  $\mu$ M (Fig. 15B) dio como resultado un  $z\delta = 2.15$  y una  $K_d(0) = 1.37$  mM. Al usar estos parámetros en el ajuste de la curva  $I_{ee}$ -V obtenida sin Ba<sup>2+</sup> agregado (Fig. 15C), se pudo estimar que el Ba<sup>2+</sup> contaminante presente en la solución interna, alcanza a 144 nM. El valor concuerda con el obtenido a partir del análisis cinético del bloqueo a distintas [Ba<sup>2+</sup>] (ver sección 2.2). Este resultado fue una primera indicación que la inhibición de la corriente observada en un medio sin Ba<sup>2+</sup> agregado se debe a un bloqueo inducido por el Ba<sup>2+</sup> contaminante.

## 2.2. Propiedades del bloqueo de las corrientes hSlo inducido por el $Ba^{2+}$ interno.

### Estimación de la concentración de $Ba^{2+}$ contaminante.

En la figura 15A se puede observar que a una  $[Ba^{2+}]$  constante, la relajación de las corrientes se puede ajustar con una función exponencial simple a todos los potenciales donde se observa bloqueo. Adicionalmente, la velocidad con que las corrientes se bloquean es directamente proporcional a la  $[Ba^{2+}]$  (Fig.16); sin embargo la recuperación desde el bloqueo es independiente de la  $[Ba^{2+}]$  (Fig. 17). Estas características concuerdan con un modelo de interacción del bloqueador con un solo sitio, como el considerado en el esquema E5:



En este modelo, la fracción de corriente remanente en el equilibrio,  $f_{lr}$ , la constante de tiempo de decaimiento,  $\tau_d$ , y la constante de tiempo de recuperación ( $\tau_r$ ; ver ecuación 23) están dadas por las siguientes expresiones:

$$f_{lr} = \beta / (k_1 \cdot [Ba^{2+}] + \beta) \quad (17)$$

$$\tau_d = 1 / (k_1 \cdot [Ba^{2+}] + \beta) \quad (18)$$

$$\tau_r \approx 1 / \beta. \quad (19)$$

El modelo predice que la velocidad calculada de bloqueo,  $\alpha$ , debe ser directamente proporcional a la  $[Ba^{2+}]$  libre en la solución interna, de acuerdo a la relación:

$$\alpha = k_1 \cdot [Ba^{2+}]. \quad (20)$$

Estas relaciones permiten calcular las velocidades de entrada y salida del bloqueo a partir de la medición de la razón de corriente remanente en estado estacionario en relación a la corriente máxima ( $f_{lr}$ ), y del ajuste de una función exponencial a la relajación de la corriente ( $\tau_d$ ). Al combinar las ecuaciones 17 y 18 tenemos:

$$f_{lr} = \beta \cdot \tau_d \quad (17a)$$

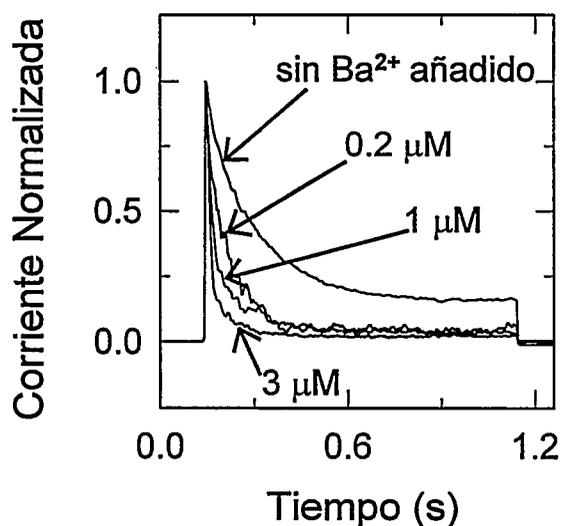
y de esta relación se puede obtener  $\beta$ :

$$\beta = f_{lr} / \tau_d \quad (21)$$

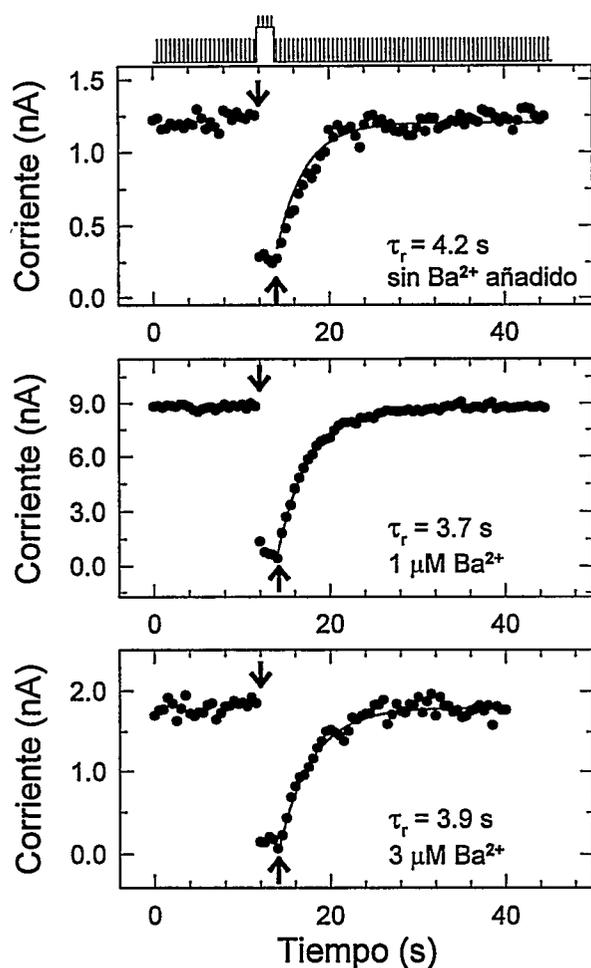
$\alpha$  se obtiene entonces sustituyendo el valor calculado de  $\beta$  en la ecuación 18 y reordenando:

$$\alpha + \beta = 1 / \tau_d \quad (18a)$$

$$\alpha = (1 / \tau_d) - \beta \quad (22)$$



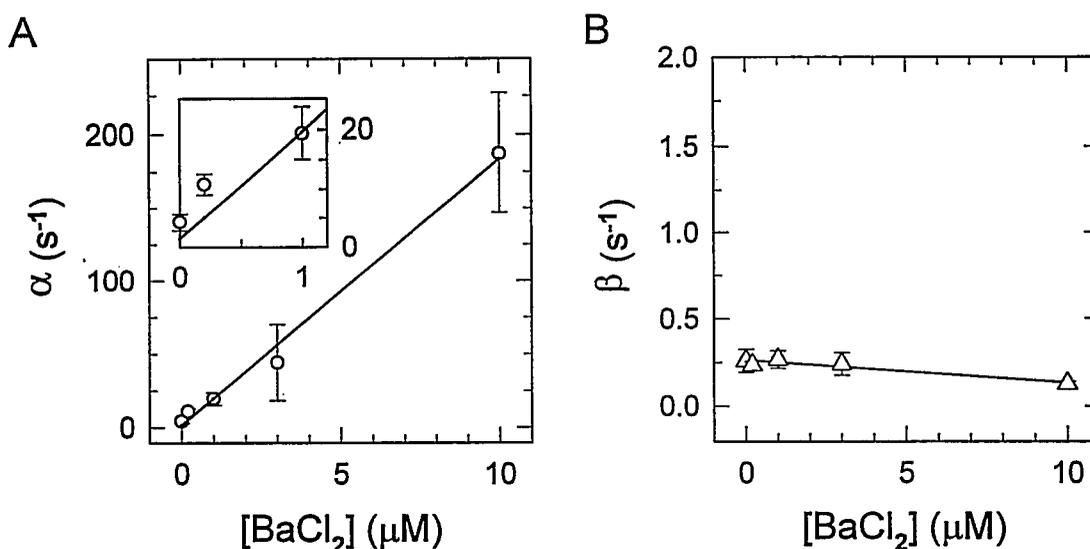
**Figura 16.** Efecto del  $Ba^{2+}$  interno en la cinética de entrada al estado bloqueado. El  $Ba^{2+}$  interno acelera la velocidad de inhibición de la corriente. Superposición de las corrientes inducidas por un pulso de 150 mV en parches escindidos con la cara interna hacia el baño, sin  $Ba^{2+}$  añadido (registro superior) y en presencia de las  $[Ba^{2+}]$  indicadas. En todos los casos el potencial de mantención fue 0 mV y la  $[Ca^{2+}]$  fue la contaminante (10  $\mu M$ ). Para comparar las velocidades de bloqueo, las corrientes fueron normalizadas a su valor máximo.



**Figura 17.** El tiempo de recuperación desde el estado bloqueado,  $\tau_r$ , es independiente de la  $[\text{Ba}^{2+}]$ .

El parche de membrana se escindió con la cara interna hacia el baño y se mantuvo a 0 mV. La corriente se monitoreó con pulsos de prueba de 100 mV y 5 ms, a una frecuencia de 2 Hz. Las flechas indican el inicio y el fin de un pulso de 150 mV y 2 s, que induce el bloqueo de las corrientes *hSlo*. La recuperación de la corriente, medida con el pulso de prueba, tiene un curso temporal exponencial (línea continua). Se muestra la recuperación de la corriente para tres parches distintos, sin bario agregado (arriba), con  $\text{Ba}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$  (al centro) y con  $\text{Ba}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$  (abajo). El esquema sobre el gráfico superior corresponde al protocolo de estimulación.

Las predicciones del modelo concuerdan con los resultados obtenidos. En la figura 18A se puede observar que la velocidad de bloqueo  $\alpha$  es una función lineal de la concentración de  $\text{Ba}^{2+}$ . Es necesario notar que los valores de  $\alpha$  obtenidos con concentraciones de  $\text{Ba}^{2+}$  decrecientes tienden hacia el valor de  $\alpha$  obtenido sin  $\text{Ba}^{2+}$  añadido (Fig. 18A, recuadro). Este valor de  $\alpha$ , que según la ecuación 20 se espera que sea cero, se debería a la presencia de cantidades contaminantes del catión  $\text{Ba}^{2+}$ . La extrapolación de la línea recta ajustada a los datos de la figura 18 a  $\alpha = 0$ , indica



**Figura 18.** Dependencia del Ba<sup>2+</sup> de las velocidades de entrada y salida del bloqueo.

**A.** La velocidad de entrada al bloqueo,  $\alpha$ , se calculó a partir de las corrientes inducidas por pulsos de 150 mV a las [BaCl<sub>2</sub>] interno indicadas (ver Fig. 15). Se midió la corriente máxima y en el estado estacionario. La relajación de la corriente se ajustó con una exponencial simple ( $\tau_d$ ).  $\alpha$  se obtuvo usando las ecuaciones 21 y 22, según se indica en el texto. La línea recta es el ajuste de la ecuación 20 a los datos, con un parámetro de pendiente  $k_f = 1,8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . En el recuadro se muestra el mismo gráfico para resaltar que sin BaCl<sub>2</sub> añadido el intercepto en el eje Y es 1.4 s<sup>-1</sup> y no cero como predice la ecuación 20. **B.** La constante de velocidad de salida desde el estado bloqueado,  $\beta = (1 / \tau_r) - \alpha$ , a 0 mV se obtuvo de experimentos del tipo mostrado en la figura 17. La línea es el ajuste de una recta a los datos experimentales, con una pendiente de  $1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , y un intercepto de 0,26 s<sup>-1</sup>. Las barras representan la desviación estándar. El número de observaciones varió de 3 a 6 experimentos.

que la contaminación de Ba<sup>2+</sup> alcanza a 70 nM. Esta observación concuerda con la idea que el Ba<sup>2+</sup> contaminante presente en la solución interna (baño) es responsable de la inhibición de la corriente observada cuando no se agrega Ba<sup>2+</sup>.

En la figura 18B se aprecia que la velocidad de recuperación desde el estado bloqueado,  $\beta$ , es independiente de la [Ba<sup>2+</sup>]. Dado que la recuperación de la corriente

se midió en presencia de  $Ba^{2+}$  (ver Fig. 17), la relajación de la corriente desde el estado bloqueado,  $\tau_r$ , está dada por la siguiente expresión:

$$\tau_r = 1 / (k_1 \cdot [Ba^{2+}] + \beta). \quad (23)$$

donde  $k_1 \cdot [Ba^{2+}] = \alpha$  (ec. 20). Sin embargo, se debe considerar que el bloqueo es dependiente del potencial (Fig. 15B). La dependencia del potencial de las constantes de velocidad ( $\alpha(V)$  y  $\beta(V)$ ) fue cuantificada de acuerdo a (Woodhull, 1973):

$$\alpha(V) = \alpha_0 \cdot \exp(z \cdot \delta' \cdot F \cdot V / (R \cdot T)) \quad (24a)$$

$$\beta(V) = \beta_0 \cdot \exp(z \cdot \delta'' \cdot F \cdot V / (R \cdot T)) \quad (24b)$$

donde  $\alpha_0$  y  $\beta_0$  son las constantes de velocidad cuando  $V = 0$  mV,  $\delta'$  es la distancia eléctrica desde la solución interna hasta el pico de la barrera de energía que el  $Ba^{2+}$  debe superar para alcanzar su sitio, y  $\delta''$  es la distancia entre el sitio de unión del  $Ba^{2+}$  en el poro del canal hasta el pico de la barrera ya mencionada. Así entonces, se cumple que la suma de las distancias  $\delta'$  y  $\delta''$  es igual a la distancia eléctrica del sitio de  $Ba^{2+}$  ( $\delta$ ):

$$\delta = \delta' + \delta'' \quad (25)$$

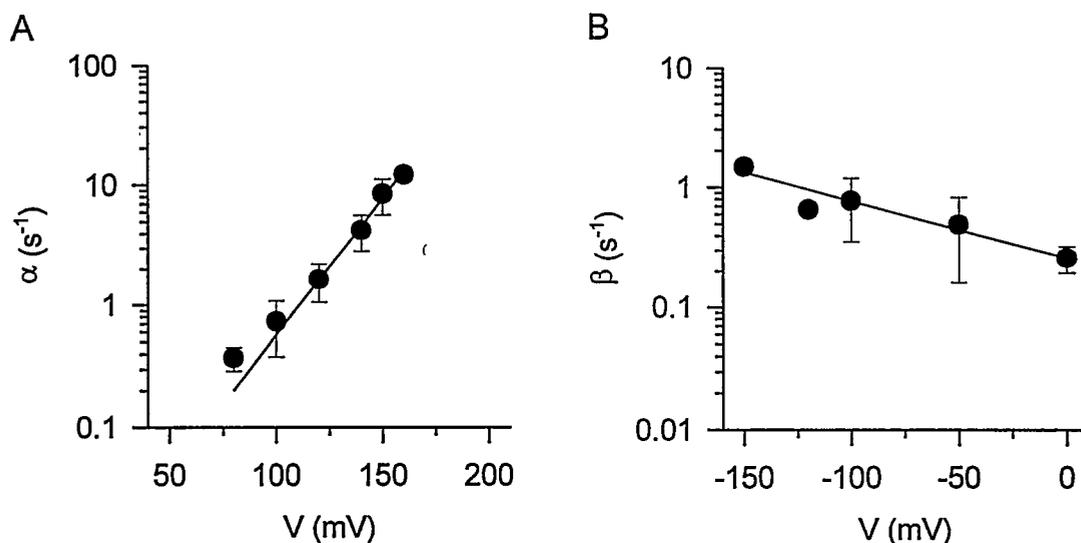
En la figura 19A se puede observar que  $\alpha$  depende del potencial con una tasa de cambio de  $e$  veces cada  $19,2 \pm 1,5$  mV. Esta dependencia corresponde a un  $\delta' = 0,66 \pm 0,05$  e implica que a 0 mV, el voltaje en que se midió la recuperación del bloqueo (Fig. 17), el valor de  $\alpha$  es de  $3,15 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ . Este valor es entre 60 a 100 veces más pequeño que  $\beta$ , y por lo tanto la contribución del proceso de bloqueo ( $\alpha$ ) a la relajación de la corriente en el experimento de recuperación desde el bloqueo (Fig. 17)

es despreciable. Se puede considerar entonces que  $\beta$  es esencialmente independiente de la  $[Ba^{2+}]$  en el intervalo examinado (Fig. 19B), comprobándose la suposición hecha en la ecuación 19 ( $\beta \approx 1 / \tau_D$ ).

La velocidad de salida desde el estado bloqueado,  $\beta$ , fue medida a potenciales iguales o menores que 0 mV para favorecer este proceso en relación a la velocidad de bloqueo  $\alpha$  (Fig. 19B). Los resultados indican que la salida del  $Ba^{2+}$  desde su sitio es solo débilmente dependiente del voltaje, con un  $\delta''$  de  $0,14 \pm 0,02$ , que implica un cambio de  $e$  veces cada  $92 \pm 13$  mV. De la ecuación 25 se puede estimar que el sitio de unión del  $Ba^{2+}$  se encuentra a una distancia eléctrica de  $0,8 \pm 0,07$  en el campo. Tomando en cuenta el error experimental, la determinación concuerda razonablemente con la distancia eléctrica del sitio de  $Ba^{2+}$  obtenida de las medidas en estado estacionario, que indican que el sitio está a una distancia eléctrica  $\delta = 1,03 \pm 0,38$  ( $n = 13$ ).

2.2.1. *El éter corona quelante de  $Ba^{2+}$ , A18C6T, inhibe el decaimiento de la corriente observado sin  $Ba^{2+}$  agregado.*

En la figura 20A se puede apreciar un ejemplo de la inhibición de la corriente  $hSlo$  observada con un pulso de 140 mV. Cuando la solución del baño contiene 50  $\mu M$  del quelante de  $Ba^{2+}$ , A18C6T (Fig. 12, Materiales y Métodos), la inhibición de la corriente se remueve completamente. Las curvas de corriente en estado estacionario en

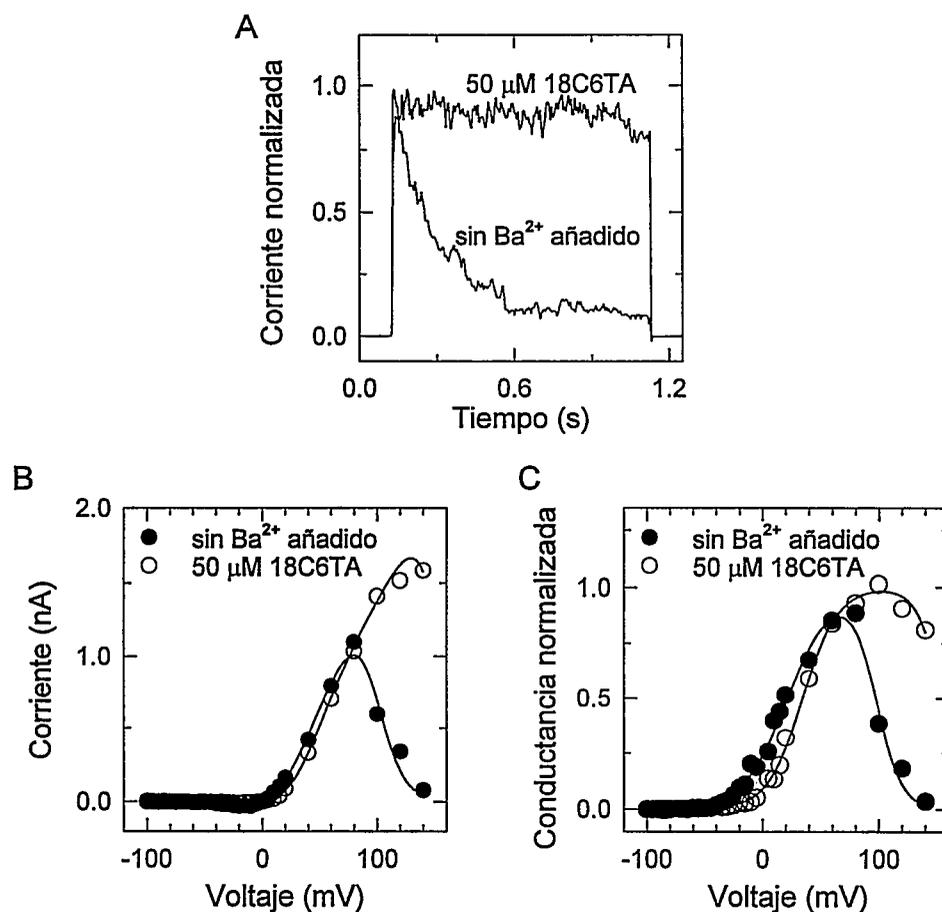


**Figura 19.** Dependencia del potencial de las constantes de velocidad de entrada al estado bloqueado ( $\alpha$ ) y de salida del mismo ( $\beta$ ).

Para facilitar la comparación entre A y B, en ambos gráficos la ordenada cubre cuatro ordenes de magnitud y la abscisa 170 mV. En todos los casos la  $[Ca^{2+}]$  fue  $10 \mu M$  en presencia de  $Ba^{2+}$  contaminante. A. La relajación de las corrientes inducidas por pulsos de los voltajes indicados fue ajustada con una exponencial simple. La constante  $\alpha$  se calculó a partir de la constante de tiempo de la exponencial ajustada ( $\tau_D$ ) y de la fracción de corriente remanente,  $f_{ir}$ , usando las ecuaciones 21 y 22 según se indica en el texto. La línea continua es el mejor ajuste ponderado de los datos según el número de determinaciones,  $n$  ( $n = 13$  para 100, 120 y 140 mV;  $n = 5$  para 80 y 150 mV;  $n = 1$  para 160 mV) con la ecuación 24a con parámetros  $\alpha(0) = 3,15 \cdot 10^{-3} \pm 1,89 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ , y  $\delta' = 0,66$ . B. La constante de velocidad de salida del bloqueo,  $\beta$ , fue determinada como se detalla en la figura 18B, para el intervalo de potenciales entre -150 mV y 0 mV. A 0 mV  $\alpha$  es entre 60 a 100 veces menor que  $\beta$ , y a -150 mV  $\alpha$  es aproximadamente  $10^6$  veces menor que  $\beta$ . La línea continua es el mejor ajuste ponderado de los datos según el número de determinaciones,  $n$  ( $n = 13$  a 0 mV;  $n = 4$  a -50 mV;  $n = 2$  a -100 mV y  $n = 1$  a -120 y -150 mV) con la ecuación 24b con parámetros  $\beta(0) = 0,25 \pm 0,04 s^{-1}$ , y  $\delta'' = 0,14 \pm 0,02$

función del potencial en condición control (sin  $Ba^{2+}$  agregado) y con  $50 \mu M$  del éter corona se observan en la figura 20B. La adición del quelante de  $Ba^{2+}$  al lado intracelular de la membrana reduce la inhibición de la corriente en todos los

potenciales donde ésta se observa en condición control. En la figura 20C se muestra la relación de conductancia normalizada en función del potencial, para los datos graficados en la figura 20B. El quelante induce un leve desplazamiento hacia la derecha de la curva de activación ( $\approx 13$  mV). Esta observación concuerda con el hecho que el A18C6T es capaz de unir  $\text{Ca}^{2+}$  (Dietrich, 1985). Por lo tanto, el corrimiento de la curva de activación hacia potenciales más positivos se debe al secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por el quelante. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre de las soluciones usadas se midió con un electrodo de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrándose que la concentración del catión disminuyó de  $10 \mu\text{M}$  a  $7 \mu\text{M}$  luego de la adición de A18C6T  $50 \mu\text{M}$ . Usando la constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo A18C6T- $\text{Ba}^{2+}$  (ver más adelante), las  $K_d$  de los complejos del éter corona con  $\text{K}^+$  y con  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran en la literatura (Dietrich, 1985), y suponiendo una  $[\text{Ba}^{2+}]$  contaminante de  $70 \text{ nM}$ , según se estimó en la figura 18A, se calculó que  $50 \mu\text{M}$  de éter corona reduce la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de  $10 \mu\text{M}$  a  $8,7 \mu\text{M}$  y la  $[\text{Ba}^{2+}]$  de  $70 \text{ nM}$  a  $7 \text{ nM}$ . Los experimentos indican entonces que la remoción de la inhibición de la corriente que se observa al añadir A18C6T  $50 \mu\text{M}$  se debe a la disminución de la  $[\text{Ba}^{2+}]$  contaminante que está bloqueando la conducción de corriente.

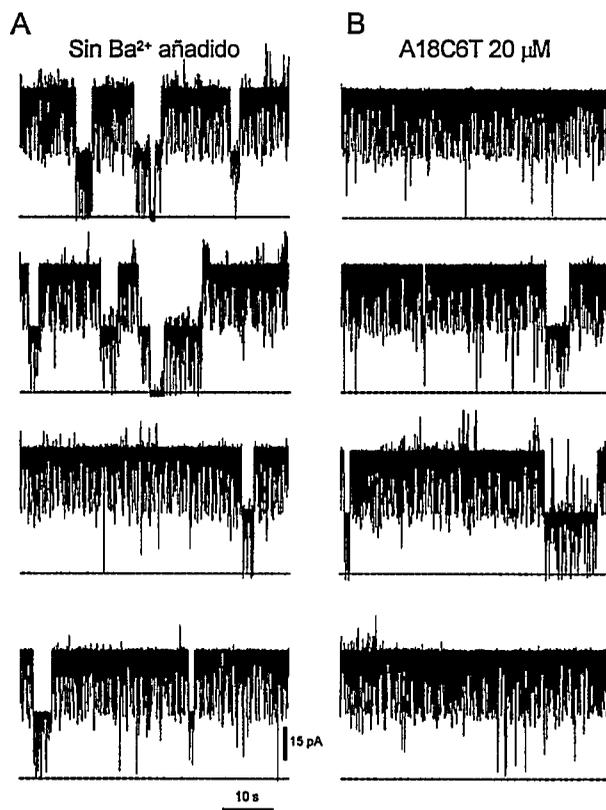


**Figura 20.** El quelante de Ba<sup>2+</sup>, A18C6T, remueve la inhibición de la corriente.

**A.** Registros de corriente obtenidos sin Ba<sup>2+</sup> añadido y con A18C6T 50 μM. Pulso de 140 mV desde un potencial de mantención de 0 mV. **B.** Curvas de corriente en estado estacionario en función del potencial, en condición control (sin Ba<sup>2+</sup> añadido) y en presencia de 50 μM de A18C6T en la solución interna (baño), del experimento mostrado en A. **C.** Gráfico de conductancia normalizada en función del potencial para los datos graficados en B. Los datos de conductancia se calcularon con:  $G = I / (V - E_R)$ , y se normalizaron por la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) obtenida del ajuste de la ecuación 15 a los datos (línea continua). Suponiendo una [Ba<sup>2+</sup>] contaminante de 70 nM (Fig. 18A) se obtuvieron los siguientes valores para la curva sin Ba<sup>2+</sup> agregado:  $G_{max} = 15$  nS,  $z_{eq} = 1,35$ ,  $V_0 = 22$  mV,  $K_d(0) = 646$  μM y  $z\delta = 2,4$ . La curva en presencia de A18C6T 50 μM se ajustó usando  $K_d(0) = 646$  μM y  $z\delta = 2,4$ . Los valores ajustados fueron:  $G_{max} = 14$  nS,  $z_{eq} = 1,7$ ,  $V_0 = 35$  mV, y [Ba<sup>2+</sup>] = 0,27 nM. El desplazamiento de la curva G-V se debe a una disminución de la [Ca<sup>2+</sup>] de 10 μM a 7 μM, medida con un electrodo de Ca<sup>2+</sup>. Esta disminución de la [Ca<sup>2+</sup>] concuerda con la calculada (8,7 μM) usando las constantes de disociación de los complejos del quelante con K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Ba<sup>2+</sup>.

2.2.2. El quelante de  $Ba^{2+}$  aumenta la duración de los períodos activos de los canales *hSlo*.

Los canales  $K_{Ca}$  reconstituidos en membranas artificiales presentan estados cerrados de larga duración, aun cuando no se ha añadido  $Ba^{2+}$  a la solución interna (Vergara y Latorre, 1983, Neyton y Miller, 1988). A nivel de canales únicos, la adición de éter corona ( $50 \mu M$ ) a la solución interna, disminuyó la frecuencia de los estados cerrados de larga duración, aumentado la duración de los períodos de actividad (Fig. 21, Díaz y col. 1996; Neyton, 1996). Estos resultados indican que el  $Ba^{2+}$



**Figura 21.** El quelante de  $Ba^{2+}$ , A18C6T, decrece la frecuencia de los estados cerrados de larga duración.

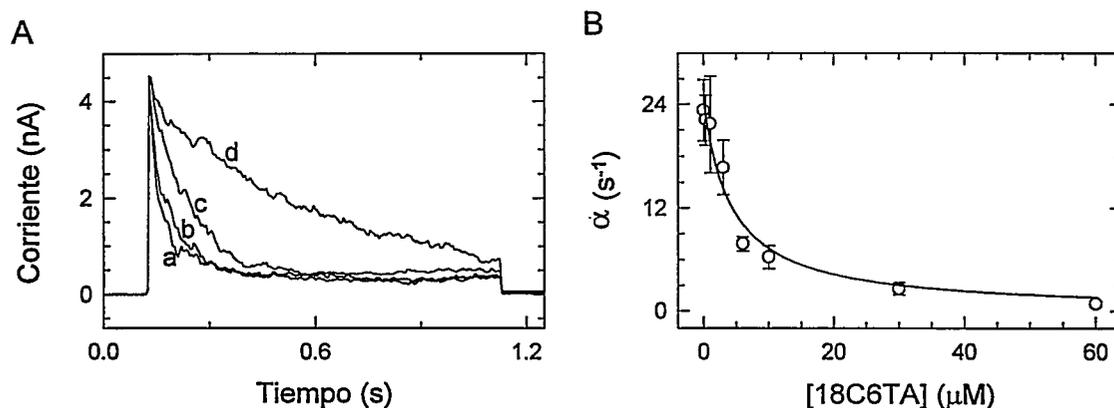
Los canales *hSlo* se incorporaron a una bicapa artificial a partir de una preparación de membrana de oocitos de *Xenopus laevis*, previamente microinyectados con el mRNA de *hSlo*. A. Registro de canales *hSlo* obtenidos en 220 mM de KCl simétrico, a 80 mV. La  $[Ca^{2+}]$  interno fue  $50 \mu M$ , sin  $Ba^{2+}$  añadido. Los estados cerrados largos pueden explicarse como períodos de bloqueo por el  $Ba^{2+}$  contaminante, de  $\approx 4$  s de duración. B. Registro obtenido de la misma bicapa observada en A, luego de añadir  $20 \mu M$  de A18C6T. El quelante dobló la duración de los períodos de actividad, de  $15 \pm 3$  (control, sin  $Ba^{2+}$  añadido, número de eventos = 10) a  $30 \pm$

8 s ( $20 \mu M$  de A18C6T, número de eventos = 6). El quelante no modificó la duración de los períodos bloqueados (control:  $3,9 \pm 3$  s,  $n = 9$  eventos;  $20 \mu M$  de A18C6T:  $4 \pm 3$  s,  $n = 4$  eventos). Figura tomada de Díaz y col. 1996.

contaminante presente en la solución interna es responsable de los estados cerrados de larga duración observados en la actividad de canales únicos, como también de la inhibición de las corrientes macroscópicas, observada a potenciales  $\geq 100$  mV.

### 2.3. El éter corona A18C6T remueve el bloqueo inducido por $Ba^{2+}$ .

Para confirmar adicionalmente que el éter corona A18C6T actúa como quelante de  $Ba^{2+}$ , se hizo una curva de respuesta al éter corona, en presencia de  $Ba^{2+}$  1  $\mu$ M. Esta concentración de  $Ba^{2+}$  induce un bloqueo marcado de la corriente *hSlo* inducida por pulsos de 150 mV (Fig. 15). Como se espera de una atenuación del bloqueo por el éter corona, al agregar concentraciones crecientes de A18C6T al baño se produce un aumento del tiempo de decaimiento ( $\tau_D$ ) y de la fracción de corriente remanente (Fig. 22A). En la figura 22B se grafica la velocidad de bloqueo deducida de la relajación de las corrientes frente al pulso de 150 mV, en función de la [A18C6T]. Si el efecto del quelante es disminuir la [ $Ba^{2+}$ ] libre, se espera que concentraciones crecientes del quelante disminuyan la velocidad del bloqueo ( $\alpha$ ). La curva se ajustó con una isoterma de Langmuir con un coeficiente de Hill de 1,2. Este hallazgo concuerda con una estequiometría del complejo A18C6T- $Ba^{2+}$  de 1:1. Tomando en cuenta la ecuación 20, la curva de la figura 22B se puede interpretar como una curva de titulación del  $Ba^{2+}$ . Así, la [ $Ba^{2+}$ ] libre para cada [A18C6T] ( $[Ba^{2+}]_{A18C6T}$ ) se obtiene dividiendo  $\alpha$  en presencia del quelante ( $\alpha_{A18C6T}$ ) por  $\alpha$  en ausencia del mismo ( $\alpha_0$ ):



**Figura 22.** El quelante de  $\text{Ba}^{2+}$ , A18C6T, decrece la velocidad de bloqueo,  $\alpha$ .

**A.** Corrientes inducidas por pulsos de 150 mV con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{BaCl}_2$  (registro a) o con la misma  $[\text{Ba}^{2+}]$  más A18C6T 3  $\mu\text{M}$  (registro b), 10  $\mu\text{M}$  (registro c) o 30  $\mu\text{M}$  (registro d). La  $[\text{Ca}^{2+}]$  fue 100  $\mu\text{M}$  en todos los casos. **B.** Velocidad de bloqueo,  $\alpha$  (círculos abiertos: datos experimentales  $\pm$  D.S de 3 a 8 experimentos), obtenida con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{BaCl}_2$  interno, o con las concentraciones de A18C6T indicadas. La línea representa el ajuste de una isoterma de Langmuir a los datos:  $\alpha = \alpha_{\text{max}} / \{1 + ([\text{A18C6T}] / K)^N\}$  con parámetros  $\alpha_{\text{max}} = 22,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $K = 4,54 \text{ mM}$  y  $N = 1,2$ .

$$[\text{Ba}^{2+}]_{\text{A18C6T}} = (\alpha_{\text{A18C6T}} / \alpha_0) \cdot [\text{Ba}^{2+}]_0 \quad (26)$$

donde  $[\text{Ba}^{2+}]_0$  es la concentración de  $\text{Ba}^{2+}$  en ausencia del quelante (1  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, a partir de la figura 22B se puede calcular la constante de disociación del complejo A18C6T- $\text{Ba}^{2+}$ . Para calcular dicha constante se debe considerar todas aquellas interacciones relevantes del quelante con otras especies presentes en la solución. La constante se calculó entonces tomando en cuenta los equilibrios simultáneos del A18C6T con el  $\text{Ba}^{2+}$ , el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  (ver apéndice I). Usando la constante de disociación del complejo A18C6T- $\text{K}^+$ : ( $K_d^{\text{K}} = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ), y la del complejo A18C6T- $\text{Ca}^{2+}$ , ( $K_d^{\text{Ca}} = 10^{-8} \text{ M}$ ; Dietrich, 1985), se obtuvo una constante de disociación para el complejo A18C6T- $\text{Ba}^{2+}$ ,  $K_d^{\text{Ba}}$ , de  $1,6 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ . Los compuestos éter

corona tienen cavidades de diferentes diámetros en el centro del anillo poliéter. Los miembros de la familia 18-corona-6 tienen un diámetro de la cavidad de 2,6 a 3,2 Å, y por lo tanto son capaces de unir  $K^+$  (2,66 Å) y  $Ba^{2+}$  (2,68 Å). Aunque la razón  $K_d^K / K_d^{Ba}$ , para el compuesto 18-corona-6 (18C6) es  $\approx 56$ , el resultado descrito previamente indica que la razón aumenta a  $2,06 \cdot 10^4$  para el A18C6T.

A partir de los resultados descritos en la sección 2, se puede descartar entonces la existencia de un proceso de inactivación dependiente del potencial, intrínseca de los canales *hSlo*. La similitud del proceso de inhibición observado sin  $Ba^{2+}$  añadido con el que se observa al agregar  $Ba^{2+}$  indica que el primero es también un bloqueo de la conducción de *hSlo* inducido por el  $Ba^{2+}$  contaminante. Más aun, la capacidad del quelante de  $Ba^{2+}$ , A18C6T, de remover la inhibición observada sin  $Ba^{2+}$  añadido como también el bloqueo inducido por  $Ba^{2+}$  agregado, sugiere fuertemente que los dos fenómenos resultan de un bloqueo por  $Ba^{2+}$  interno.

### 3. *Propiedades de la activación de los canales hSlo expresados en oocitos de Xenopus laevis.*

Los canales  $K_{Ca}$  *hSlo* clonados del miometrio humano (Wallner y col. 1995) expresados en oocitos de *Xenopus laevis* son, como los canales nativos, activados por la despolarización de la membrana o por un aumento de la  $[Ca^{2+}]$  interno (Fig. 13; Blatz y Magleby, 1987; Latorre y col. 1989; McManus, 1991). La dependencia del voltaje y del  $Ca^{2+}$  de la activación se caracterizaron estudiando las corrientes

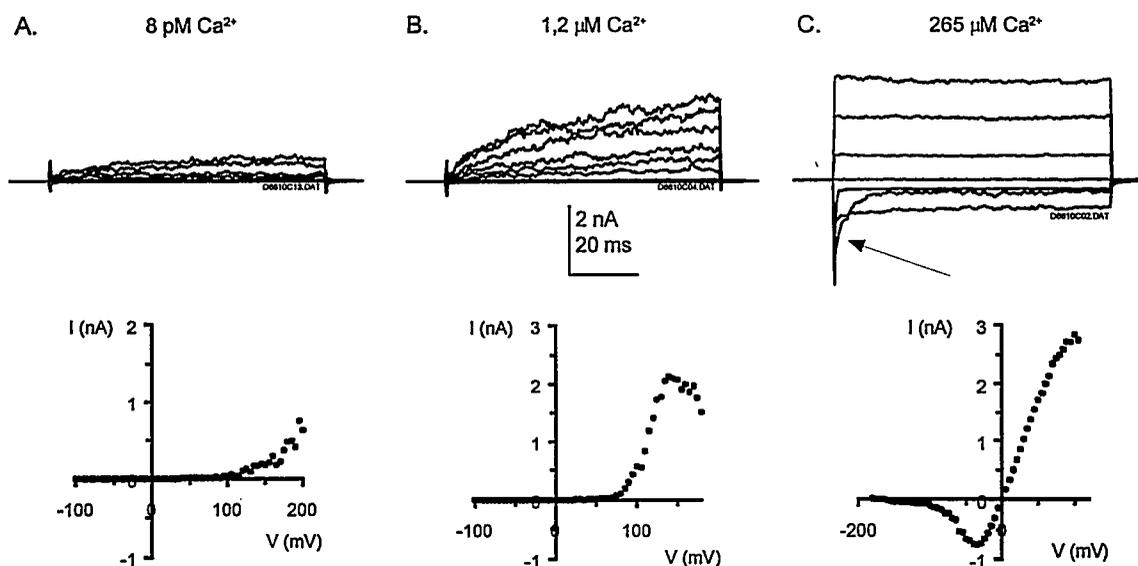
macroscópicas en macroparches de membrana. Las corrientes se activaron con pulsos rectangulares de potencial en el intervalo de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  comprendido entre picomolar y milimolar. Un ejemplo típico de las corrientes observadas en estas condiciones se muestra en la figura 23. Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es del orden picomolar (Fig. 23A) las corrientes solo pueden ser activadas por pulsos despolarizantes  $\geq$  a 100 mV; esta característica se traduce en que el pie de la curva de corriente en estado estacionario ( $I_{EE}$ ) en función del potencial (curva  $I_{EE}$ -V) se ubica a potenciales  $\geq$  100 mV. Esta conducta se repite en el intervalo de  $[\text{Ca}^{2+}]$  comprendido entre 8 pM y  $\approx$  100 nM (ver figura 24). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa a 1,2  $\mu\text{M}$ , el pie de la curva  $I_{EE}$ -V se desplaza hacia la izquierda en el eje del voltaje y la magnitud de la corriente máxima obtenida aumenta (Fig. 23B). Si la  $[\text{Ca}^{2+}]$  se aumenta a 265  $\mu\text{M}$ , los pulsos hiperpolarizantes  $\leq$  a -50 mV, inducen corrientes instantáneas que posteriormente se relajan a un nivel estacionario menor (Fig. 23C, flecha). Estas corrientes se deben al cambio en la fuerza electromotriz del  $\text{K}^+$  inducido por el pulso de potencial y a que a esta  $[\text{Ca}^{2+}]$  hay una población de canales que se encuentran abiertos al potencial de mantención (0 mV). Así entonces, la relajación de las corrientes instantáneas refleja el cierre de los canales a esos potenciales negativos.

La activación de las corrientes *hSlo* se caracterizó a partir de las curvas de conductancia en función del potencial (curva G-V). Estas se construyeron utilizando las curvas  $I_{EE}$ -V y la ecuación 13 (Métodos):

$$G = I_{EE} / (V - E_K) \quad (13)$$

La curva G-V se describió ajustando a ella una distribución de Boltzmann y normalizándola por la conductancia máxima obtenida en el parche (Ec. 14, Métodos):

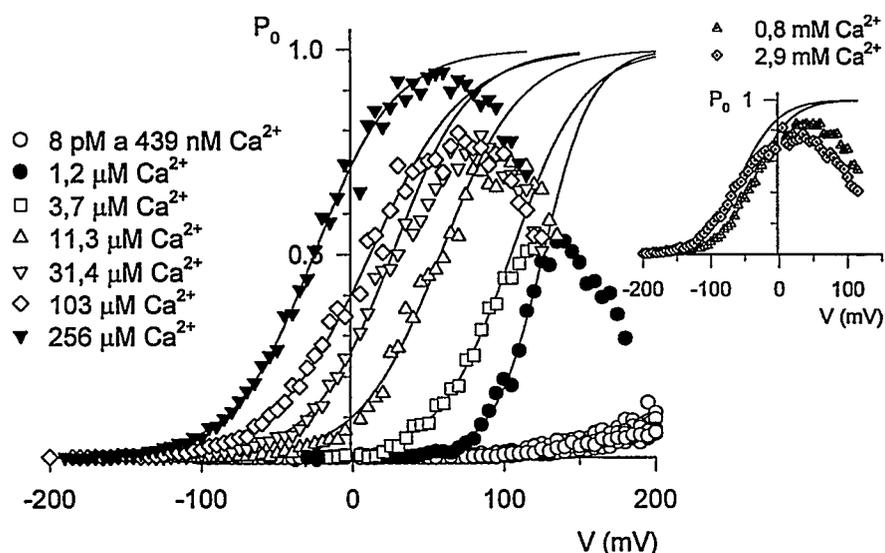
$$P_o = G / G_{max} = [1 + \exp(-z_{eq} \cdot F \cdot (V_{1/2} - V) / (R \cdot T))]^{-1} \quad (11)$$



**Figura 23.** Corrientes *hSlo* típicas expresadas en oocitos de *Xenopus laevis*.

Familias de corrientes obtenidas en un mismo macroparche de membrana, inducidas por pulsos de voltaje desde un potencial de mantención de 0 mV (panel superior). Los gráficos de corriente en estado estacionario en función del potencial (curvas  $I_{EE}-V$ ), se observan en la zona inferior de la figura. La  $[Ca^{2+}]$  libre se tamponó con EDTA (A) o HEDTA (B y C, ver Métodos). La concentración de  $K^+$  fue de 110 mM, simétrica. Estas condiciones se repiten todos los experimentos, a menos que se indique lo contrario. A. Corrientes obtenidas con una  $[Ca^{2+}] = 8$  pM. El parche se estimuló con pulsos de potencial entre -100 y 200 mV, cada 5 mV. Se muestran los registros que corresponden a los pulsos de -100, 20, 100, 120, 150, 180 y 200 mV. B. La  $[Ca^{2+}]$  fue 1,2  $\mu$ M. Se muestran las corrientes inducidas por pulsos de -100, 20, 60 y de 90 a 140 mV, cada 10 mV. Note el desplazamiento hacia la izquierda de la curva  $I_{EE}-V$ . C. Corrientes obtenidas en 265  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ . Las corrientes corresponden a los pulsos de -180, -80, -40, 0, 20, 50 y 90 mV. Con esta  $[Ca^{2+}]$ , una fracción de los canales del parche se encuentran abiertos al potencial de mantención. El cambio en la fuerza electromotriz del  $K^+$  provocado por los pulsos de -180, -80 y -40 mV induce corrientes de entrada instantáneas y transitorias. El pulso más negativo induce un cierre más rápido y un nivel estacionario de corriente menor en relación a los pulsos de -80 y -40 mV.

Un ejemplo de este análisis se puede observar en la figura 24. Las curvas se normalizaron según la conductancia máxima medida en el parche, que en este experimento se consiguió con una  $[Ca^{2+}] = 256 \mu M$ . La figura muestra varias características de las corrientes *hSlo*, entre las que se destacan: i. Los canales *hSlo* son dependientes del potencial. A una  $[Ca^{2+}]$  fija, la despolarización de la membrana activa los canales. ii. en el intervalo de  $[Ca^{2+}]$  comprendido entre 8 pM y 439 nM la activación es independiente de la  $[Ca^{2+}]$ : cambios en la  $[Ca^{2+}]$  de más de 4 órdenes de magnitud son incapaces de modificar la activación de los canales. iii. Las curvas de activación se hacen sensibles al  $Ca^{2+}$  cuando la  $[Ca^{2+}]$  es, en promedio,  $\geq 100$  nM. A medida que la  $[Ca^{2+}]$  aumenta se necesitan potenciales cada vez menores para alcanzar un mismo nivel de probabilidad del estado abierto ( $P_o$ ). Esto se traduce en que el potencial al cual se alcanza el 50% de la conductancia o probabilidad máxima,  $V_{1/2}$ , se desplaza hacia potenciales más negativos al aumentar la  $[Ca^{2+}]$ . iv. Es evidente de las curvas que con potenciales despolarizantes se desarrolla un proceso de inhibición de la conductancia. Esta inhibición puede provocar una subestimación de la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) del parche y por lo tanto introducir una sobreestimación del número de cargas de compuerta ( $z_{eq}$ ) y un desplazamiento hacia potenciales hiperpolarizados del  $V_{1/2}$  (ver sección 5.2, Métodos).



**Figura 24.** Curvas de probabilidad del estado abierto ( $P_0$ ) normalizadas por la probabilidad máxima.

Las curvas de conductancia se obtuvieron a partir de la corriente de estado estacionario ( $I_{EE}$ - $V$ ), registradas de un mismo parche. Estas se ajustaron con la distribución de Boltzmann (Ec. 14) y se normalizaron por la conductancia máxima del parche. En el panel principal se muestran las curvas obtenidas con  $[Ca^{2+}]$  entre 8 pM y 256  $\mu$ M, según se indica en el gráfico. Las curvas marcadas con "8 pM a 439 nM  $Ca^{2+}$ " (O) incluyen además las siguientes  $[Ca^{2+}]$ : 363 pM, 53 nM, 86 nM y 187 nM. En el recuadro se graficaron las curvas de conductancia normalizada para las  $[Ca^{2+}]$  de 0,8 mM y 2,9 mM. Como se aprecia del ajuste, la conductancia obtenida con estas dos  $[Ca^{2+}]$  fue menor que la observada con 256  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ . Los parámetros de ajuste para este experimento se enumeran como  $V_{1/2}$  (mV) y  $z_{eq}$  para cada  $[Ca^{2+}]$ : 285, 0,6 (8 pM); 299, 0,6 (363 pM); 299, 0,7 (56 nM); 267, 0,8 (86 nM); 330, 0,5 (187 nM); 302, 0,6 (439 nM); 131, 1,4 (1,2  $\mu$ M); 104, 1,1 (3,7  $\mu$ M); 58, 1,0 (11,3  $\mu$ M); 26, 1,0 (31,4  $\mu$ M); 12, 0,8 (103  $\mu$ M); -22, 0,9 (256  $\mu$ M); -35, 0,9 (0,8 mM); y -56 y 0,9 (2,9 mM).

La naturaleza de esta inhibición es desconocida. Cuando la  $[Ca^{2+}]$  es alta (>256  $\mu$ M) la inhibición podría deberse a un bloqueo rápido de la corriente por  $Ca^{2+}$  (Vergara y Latorre, 1983, Oberhauser y col. 1988; Cox y col. 1997a). Con concentraciones de  $Ca^{2+}$  menores que esta (ver Fig. 23B, panel inferior), la inhibición se debería a que se alcanza un límite en la velocidad con que los iones  $K^+$  pueden

entrar y pasar a través de los canales abiertos (Cox y col. 1997a). Esta saturación se observa a potenciales  $> 100$  mV o  $< -100$  mV<sup>1</sup>.

La dependencia del  $Ca^{2+}$  de la activación, se puede visualizar más fácilmente graficando la relación entre el potencial en que se alcanza el 50% de la  $G_{max}$  ( $V_{1/2}$ ) y el logaritmo de la  $[Ca^{2+}]$  (Fig. 25; Meera y col. 1996). En la figura se pueden distinguir claramente dos intervalos de  $[Ca^{2+}]$  en los que el  $V_{1/2}$  se comporta diferencialmente. Para  $[Ca^{2+}]$  mayores que 100 nM, se observa que el  $V_{1/2}$  decrece a medida que la  $[Ca^{2+}]$  aumenta; este resultado corresponde al corrimiento hacia la izquierda de las curvas G-V con  $[Ca^{2+}]$  crecientes (Fig. 24). El corrimiento del  $V_{1/2}$  representa un cambio en la energía libre que determina el equilibrio entre las conformaciones cerradas y abiertas del canal. Así entonces, la unión de  $Ca^{2+}$  desplaza el equilibrio hacia la conformación conductora del canal. Por otro lado, cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  es menor que  $\approx 100$  nM, el  $V_{1/2}$  se hace independiente de la  $[Ca^{2+}]$  (Meera y col. 1996). Como con estas  $[Ca^{2+}]$  se alcanza una conductancia baja ( $< 20\%$  del máximo),

---

<sup>1</sup> Estos dos fenómenos podrían llevar a una subestimación de la conductancia máxima. Con el fin de estimar este posible error, las curvas de conductancia se determinaron a partir de las corrientes de cola instantáneas. La corriente observada al potencial de cola ( $V_{COLA}$ ) es proporcional al número de canales que se encuentran abiertos al final del estímulo de prueba; la curva de corriente de cola en función del potencial (curva  $G_{COLA}$ -V) es proporcional a la curva de conductancia normalizada. El bloqueo por  $Ca^{2+}$  es rápido y dependiente del potencial, favoreciéndose con potenciales positivos. Por lo tanto, si la curva de conductancia se determina a partir de las corrientes de cola registradas a un potencial negativo ( $V_{COLA} \approx -70$  mV), el bloqueo no afecta la determinación de la conductancia máxima (Cox y col. 1997a). Dado que a este potencial tampoco se alcanza la velocidad límite con que el  $K^+$  es capaz de permear el canal, este fenómeno tampoco afecta la determinación de la  $G_{max}$  (Cox y col. 1997a). Las curvas  $G_{COLA}$ -V sugieren que los valores de  $G_{max}$  obtenidos desde las curvas  $I_{EE}$ -V son correctos, pues en el intervalo de voltajes y  $[Ca^{2+}]$  en que se determinó la  $G_{max}$  en estas curvas, también se alcanza la  $G_{max}$  en la curvas  $G_{COLA}$ -V.

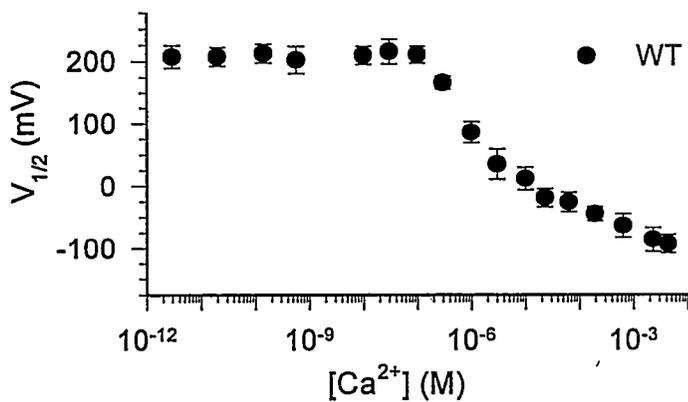
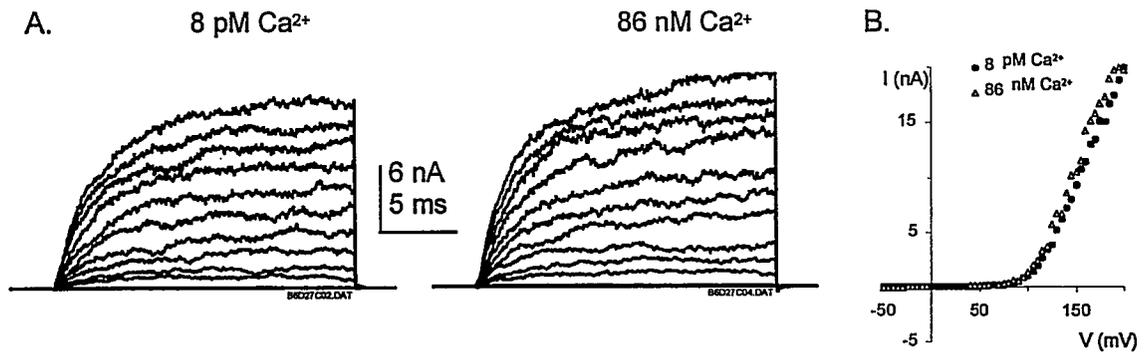


Figura 25. Dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  del  $V_{1/2}$ .

Se grafican los valores de  $V_{1/2}$  obtenidos del ajuste de una distribución de Boltzmann a las curvas  $P_0$ - $V$ , en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , para *hSlo* silvestre (WT, ●). Las barras representan la desviación standard del promedio.

la determinación del parámetro  $V_{1/2}$  a partir del ajuste de las curvas  $G$ - $V$  está sujeto a error. Sin embargo, cuando los canales *hSlo* se sobreexpresan en los oocitos de *Xenopus*, se puede obtener una evidencia adicional que refuerza el resultado recién descrito. En la figura 26A se pueden observar familias de corrientes obtenidas con 8 pM y 86 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  en un mismo parche. Las curvas  $I_{EE}$ - $V$  para ambas  $[\text{Ca}^{2+}]$  muestran que las corrientes se superponen en todo el intervalo de potenciales probados, sin ningún indicio de un corrimiento en el eje del potencial para un cambio de más de 10.000 veces en la  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Este resultado permite rechazar directamente el modelo de "activación iónica" (Fig. 5, Introducción), pues dicho modelo predice una relación lineal entre el  $V_{1/2}$  y el logaritmo de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , para cualquier intervalo de concentraciones (Wong y col. 1982). Así entonces, la dependencia del potencial de la activación no puede ser una consecuencia de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a un sitio que siente el campo eléctrico o que es modulado por él. Como las corrientes son capaces de activarse con estímulos de



**Figura 26.** Las corrientes *hSlo* son independientes del Ca<sup>2+</sup> cuando la [Ca<sup>2+</sup>] es menor que 100 nM.

**A.** Los oocitos de *Xenopus* se inyectaron con 50 nl de RNA 0,7 µg/µl de *hSlo* silvestre, clonado el vector de alta expresión M3 (Wallner y col. 1996). Las corrientes se registraron del mismo parche una semana después de la inyección. El potencial de mantenimiento fue 0 mV. En ambas condiciones las corrientes mostradas corresponden a los estímulos de -50, 0, y 50 mV, y de 100 a 190 mV cada 10 mV. Debido a la resistencia en serie (sección 4.5 Métodos), las corrientes ≥ 5 nA introducen un error ≥ 5% en el potencial de membrana (*V<sub>m</sub>*). Sin embargo, dado que los registros se utilizaron sólo para observar diferencias en la magnitud de la corriente, el error introducido en *V<sub>m</sub>* es irrelevante. **B.** Curvas de corriente en estado estacionario en función del potencial (*I<sub>EE</sub>*-*V*) para las corrientes mostradas en A. Note que un aumento de 10.000 veces en la [Ca<sup>2+</sup>] no cambia el potencial en que se activan las corrientes.

potencial en forma independiente de la [Ca<sup>2+</sup>], los canales deben poseer un sensor de potencial intrínseco. Tomando en cuenta que el sensor putativo debe ser cargado y encontrarse en el campo eléctrico transmembranal, los segmentos transmembranales que poseen aminoácidos cargados son candidatos para cumplir esta función. En el canal *hSlo* los segmentos S2, S3 y S4 cumplen con estos requisitos.

La dependencia del potencial de *hSlo* se estimó a partir del ajuste de una distribución de Boltzmann (ecuación 14) a las curvas de conductancia normalizada (curvas *P<sub>o</sub>*-*V*). De este ajuste se obtiene un número aparente de cargas de compuerta (*z<sub>eq</sub>*) que corresponde al número de cargas de compuerta cuyo movimiento en la

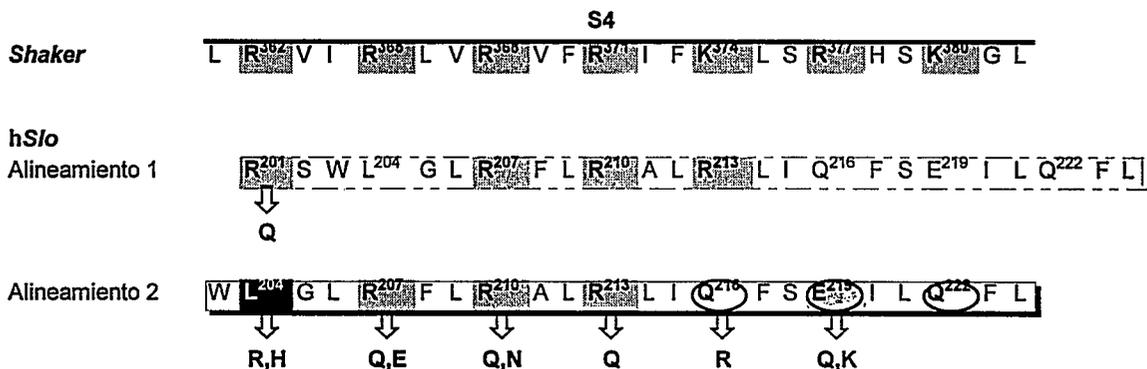
totalidad del campo eléctrico transmembranal está asociado al proceso de activación de *hSlo*.

Para *hSlo* silvestre (WT) se obtuvo un valor de  $1,43 \pm 0,36$  (promedio  $\pm$  D.S.;  $n = 31$ ). Cuando el número de cargas por canal se midió a partir de la corriente máxima de compuerta (Q) y del número de canales (N) estimado con análisis de ruido (Q/N) se obtuvo un valor de 4 a 5 cargas por canal (Stefani y col. 1997). Estos valores se contrastan con la aguda dependencia del potencial del canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker*, donde se determinó que hay 13 cargas cuyo movimiento está acoplado al proceso de activación (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y col. 1996).

### 3.1. Mutaciones puntuales del segmento S4.

Con el objetivo de probar el papel que el segmento transmembranal S4 tiene en la dependencia del potencial de *hSlo*, se realizaron mutaciones específicas de los residuos de este dominio. Los aminoácidos a mutar se eligieron de acuerdo a un alineamiento de la secuencia *hSlo* con la de canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial. La porción del alineamiento correspondiente al segmento S4 de *hSlo* con el del canal *Shaker* se muestra en en la figura 27; (el alineamiento de los segmentos S2, S3 y S4 de estos dos canales junto a los segmentos correspondientes de otros canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del potencial se puede observar en la Fig. 2 de la Introducción; Wallner y col. 1996). El alineamiento 2 (Fig. 27) predice que el segmento S4 de *hSlo* posee tres residuos positivos: las argininas 207, 210 y 213. Estos residuos fueron

mutados por aminoácidos neutros (glutamina (Q), asparragina (N)) o negativos (glutámico (E)). Estas mutaciones corresponden a: R207Q<sup>2</sup>, R207E, R210Q, R210N y R213Q. Los residuos hidrófobos (leucina 204), polares (glutamina 216) o negativos (glutamato 219) del segmento S4 de *hSlo*, pero que en *Shaker* son aminoácidos cargados positivamente, fueron mutados por residuos positivos, polares o neutros. Las mutaciones realizadas en estas posiciones son las siguientes: L204R, L204H, Q216R, E219Q y E219K. La figura 27 indica además que según el alineamiento 1 la arginina 201 podría



**Figura 27.** Alineamiento del segmento S4 de *hSlo* y del canal de K<sup>+</sup> dependiente del potencial, *Shaker*.

El alineamiento 1 se obtuvo de un alineamiento de múltiples secuencias con otros canales de K<sup>+</sup> dependientes de potencial (Wallner y col. 1996). En este alineamiento el residuo arginina 201 de *hSlo* queda incluido en el segmento S4, en posición equivalente a la arginina 362 de *Shaker*. El alineamiento 2 se obtuvo de un alineamiento de múltiples secuencias con canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> dependientes de potencial usando los 400 aminoácidos del extremo amino de *hSlo* (Wallner y col. 1996). Cajas grises: residuos cargados positivamente, conservados. Se resaltan además los residuos polares (elipse) negativos (elipse gris) e hidrófobos (caja negra) de *hSlo* que en *Shaker* son cargados positivamente. Las flechas indican las mutaciones estudiadas.

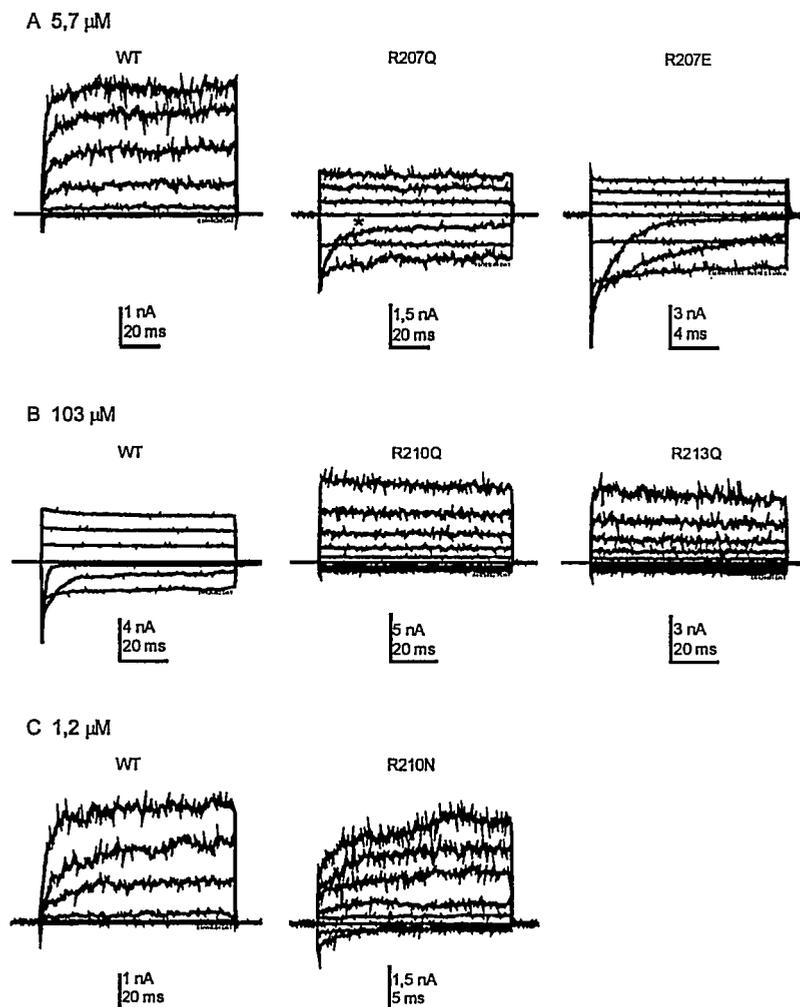
<sup>2</sup> Las mutaciones se indican con una primera letra correspondiente al residuo presente en el canal silvestre, seguida de la posición del residuo, y una última letra que indica el aminoácido introducido. Los aminoácidos se abrevian con el código de una letra: arginina: R, leucina: L, glutamina: Q, glutamato: E, histidina: H, asparragina: N, lisina: K.

formar parte del segmento S4. Este aminoácido fue mutado a glutamina (R201Q).

### 3.2. Efectos de las mutaciones del segmento S4: desplazamiento de las curvas de activación en el eje del potencial.

En las figuras 28 y 29 se pueden observar ejemplos típicos de registros de corrientes macroscópicas de los mutantes de la región S4. La primera figura agrupa a aquellos mutantes que tienen un efecto dramático en las curvas de activación de *hSlo*. Cuando la  $[Ca^{2+}]$  es  $5,7 \mu M$  (Fig. 28A), las corrientes *hSlo* silvestre (WT) se activan solamente con potenciales despolarizantes, mayores que 0 mV (ver Fig. 30A). Esta característica se altera completamente cuando la arginina 207 (R207) se muta por glutamina (Q, un aminoácido neutro) o glutamato (E, un residuo cargado negativamente). Para los mutantes R207Q y R207E los estímulos hiperpolarizantes inducen corrientes de entrada instantáneas que se relajan a un nuevo estado estacionario dependiendo del potencial. Las corrientes instantáneas se deben a que en estas condiciones cerca del 100% de los canales mutantes se encuentran activos al potencial de mantención (0 mV; ver Fig. 30A). La relajación de la corriente es más rápida y la corriente estacionaria es menor a medida que el potencial de prueba es más hiperpolarizante (Fig. 28A).

Si las argininas 210 y 213 son sustituidas por glutamina (R210Q, R213Q) los canales resultantes se activan solamente con potenciales positivos altos. En la figura 28B se observa que, a diferencia de *hSlo* WT, las corrientes de los canales R210Q y R213Q se hacen apreciables con potenciales mayores que 50 mV. Cuando la  $[Ca^{2+}]$  es



**Figura 28.** Registros de corrientes de los mutantes del segmento S4 que afectan la activación de *hSlo*.

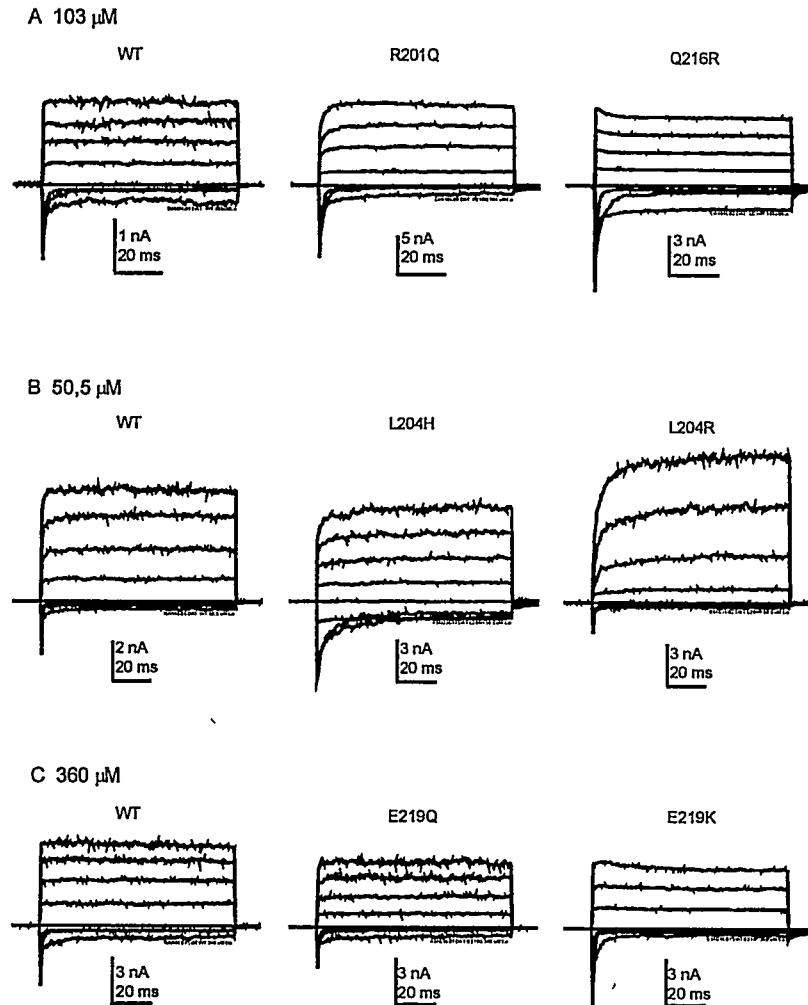
Familias de corrientes macroscópicas obtenidas de sellos escindidos, en  $\text{K}^+$  110 mM, simétrico. El potencial de mantención fue 0 mV. **A.** Corrientes de *hSlo* silvestre (WT) y de los mutantes R207Q y R207E. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  del baño (cara intracelular de la membrana) fue  $5.7 \mu\text{M}$ . Para *hSlo* WT se muestran las corrientes inducidas por estímulos de -100 mV, -50 mV y de 0 a 100 mV, cada 20 mV. Sólo los potenciales mayores que 0 mV son capaces de activar las corrientes WT. Para R207Q se muestran las corrientes inducidas por pulsos de -200 mV, -150 mV, -50 mV y de 0 a 60 mV, cada 20 mV. Para R207E se muestran corrientes obtenidas con los mismos estímulos más un trazo de corriente adicional obtenido a -250 mV. Note que la estimulación estos mutantes con voltajes negativos induce corrientes de entrada. Los asteriscos indican las corrientes inducidas por el pulso de -200 mV (R207Q) y -250 mV (R207E). **B.** Corrientes de *hSlo* silvestre (WT) y de los mutantes R210Q y R213Q.  $103 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño. Para *hSlo* WT se muestran las corrientes inducidas por estímulos de -140 mV, -80 mV, -50 mV y de 0 a 60 mV, cada 20 mV. En esta condición, los canales *hSlo* WT son capaces de activarse con a potenciales negativos. Para R210Q y R213Q se muestran corrientes inducidas

por potenciales de -100 a -25 mV cada 25 mV y de 0 a 100 mV cada 20 mV. A diferencia de *hSlo* WT, estos mutantes solo se activan con potenciales despolarizantes extremos. C. Corrientes de *hSlo* WT y del mutante R210N obtenidas con 1,2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño. Los registros se obtuvieron con estímulos de -100 mV y de 0 a 100 mV cada 20 mV para WT y con estímulos de -180 mV, -50 mV y de 0 a 100 mV cada 20 mV para R210N.

---

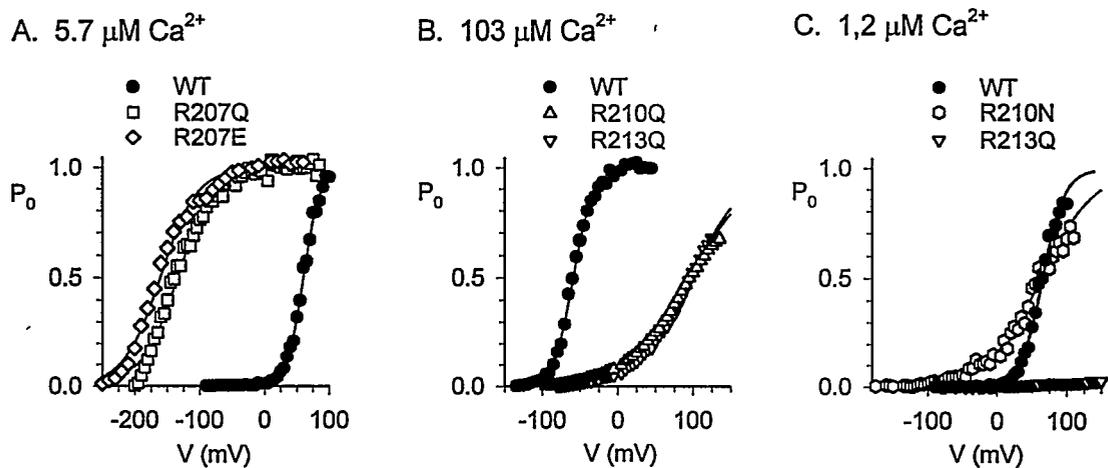
103  $\mu\text{M}$ , el potencial en que se alcanza el 50% de la activación máxima,  $V_{1/2}$ , para estos mutantes es  $\approx 100$  mV mientras que para *hSlo* WT es  $\approx -50$  mV (Fig. 30B, Tabla 2). Es interesante comparar el efecto inducido por las mutaciones R210Q y R213Q con el inducido por la sustitución de la arginina 210 con el aminoácido neutro asparragina (R210N). A diferencia de R210Q, la mutación R210N tiene como resultado canales que pueden ser activados con potenciales comparables a los necesarios para activar a *hSlo* WT (Fig. 28C,  $[\text{Ca}^{2+}] = 1,2 \mu\text{M}$ ). En la figura se puede observar además que a esta  $[\text{Ca}^{2+}]$  la activación de los canales R213Q es prácticamente nula (Fig. 30C, Tabla 2).

Las mutaciones que tuvieron efectos menores en la posición de las curvas de activación se pueden observar en la figura 29 y 31. La posición en el eje del voltaje de las curvas de activación de los mutantes L204H, Q216R, E219Q y E219K es prácticamente indistinguible de la de *hSlo* WT (ver Fig. 33). En el caso de las mutaciones R201Q y L204R las curvas de activación están desplazadas hacia potenciales despolarizantes (Fig. 31A y B, Tabla 2, ver Fig. 33), pero el efecto es de menor magnitud que el observado para los mutantes descritos en la figura 30.



**Figura 29.** Registros de corriente de los mutantes del segmento S4 que inducen efectos menores en la activación de *hSlo*.

Familias de corrientes macroscópicas obtenidas de sellos escindidos, en  $\text{K}^+$  110 mM, simétrico. El potencial de mantención fue 0 mV. **A.** Corrientes de *hSlo* silvestre (WT) y de los mutantes R201Q y Q216R obtenidas con una  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el baño (cara intracelular de la membrana) de 103  $\mu\text{M}$ . En los tres casos se muestran las corrientes inducidas por pulsos de voltaje desde -150 a 0 mV cada 50 mV, y de 20 a 80 mV, cada 20 mV. **B.** Corrientes de *hSlo* silvestre (WT) y de los mutantes L204H y L204R. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño fue 50,5  $\mu\text{M}$ . En los tres casos se muestran las corrientes inducidas por pulsos de voltaje de -150 mV, -100 mV, -30 mV, y de 0 a 80 mV, cada 20 mV. **C.** Corrientes de *hSlo* silvestre (WT) y de los mutantes E219Q y E219K. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño fue 360  $\mu\text{M}$ . En los tres casos se muestran las corrientes inducidas por pulsos de voltaje de desde -150 a 0 mV cada 50 mV, y de 20 a 80 mV, cada 20 mV (excepto para E219K donde se muestran los trazos de corriente obtenidos por pulsos de hasta 60 mV).

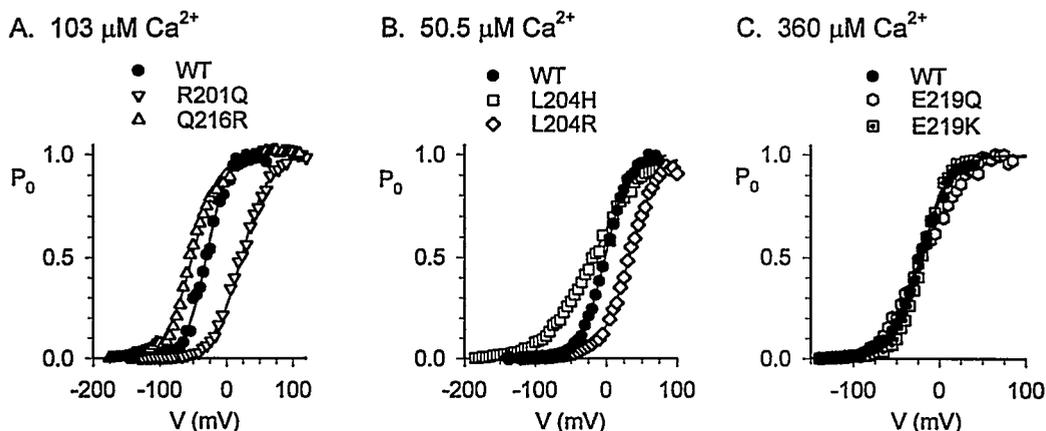


**Figura 30.** Curvas de probabilidad normalizada del estado abierto ( $P_o$ ) en función del potencial para *hSlo* silvestre y mutantes del segmento S4.

Curvas de  $P_o$  en función del potencial (curvas  $P_o$ -V) obtenidas de los datos mostrados en la figura 28. Los valores se calcularon a partir de los datos de corriente en estado estacionario, usando la ecuación 13:  $G = I_{EE} / (V - E_K)$ . Las líneas continuas son el ajuste de una distribución de Boltzmann a los datos (ecuación 14). A. Curvas  $P_o$ -V obtenidas en presencia de  $5,7 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , para *hSlo* silvestre (WT) y los mutantes R207Q y R207E. Los parámetros de ajuste,  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: 16 mV, 1,6; R207Q: -139 mV, 0,83; R207E: -161 mV, 0,88. B. Curvas  $P_o$ -V para *hSlo* WT y los mutantes R210Q y R213Q obtenidas con  $103 \mu\text{M Ca}^{2+}$ . Los valores de  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: -59 mV, 1,9; R210Q: 96 mV, 0,6; R213Q: 98 mV, 0,7. C. Curvas  $P_o$ -V para *hSlo* WT y los mutantes R210N y R213Q obtenidas en presencia de  $1,2 \mu\text{M Ca}^{2+}$ . Los valores de  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: 65 mV, 1,56; R210N: 63 mV, 0,65; R213Q: no ajustado.

### 3.3. Efectos de las mutaciones del segmento S4: modificación del número de cargas de compuerta.

Actualmente se pueden encontrar numerosas evidencias que indican que el sensor de voltaje de los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  dependientes del potencial está formado en parte por el segmento transmembranal S4 (Sthümer y col. 1989; Papazian



**Figura 31.** Curvas de probabilidad normalizada del estado abierto en función del potencial (curvas  $P_o$ -V) para *hSlo* silvestre y mutantes del segmento S4.

Curvas  $P_o$ -V obtenidas de los datos mostrados en la figura 29. Los datos y el ajuste se obtuvieron según se detalla en la figura 30. **A.** Curvas  $P_o$ -V obtenidas en presencia de 103  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , para *hSlo* silvestre (WT) y los mutantes R201Q y Q216R. Los parámetros de ajuste,  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: -31 mV, 1,6; R201Q: 22 mV, 1,18; Q216R: -51,8 mV, 1,26. **B.** Curvas  $P_o$ -V para *hSlo* WT y los mutantes L204H y L204R obtenidas con 50,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los valores de  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: -2 mV, 1,49; L204H: -36 mV, 0,91; L204R: -32 mV, 1,28. **C.** Curvas  $P_o$ -V para *hSlo* WT y los mutantes E219Q y E219K obtenidas en presencia de 360  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Los valores de  $V_{1/2}$  y  $z_{eq}$  fueron respectivamente: WT: -22,3 mV, 1,4; E219Q: -19 mV, 1,61; E219K: -20 mV, 1,78.

y col. 1991; Yang y Horn, 1995; García y col. 1996; Larsson y col. 1996; Seoh y col. 1996). Si esta hipótesis es cierta se puede esperar que una reducción del número de residuos cargados del segmento S4 de *hSlo* tendrá como resultado una disminución del número de cargas de compuerta. Cinco mutaciones del segmento S4 de *hSlo* no alteraron la pendiente de las curvas  $P_o$ -V (Tabla 1): L204H, L204R, Q216R E219Q y E219K. Adicionalmente, la neutralización de la arginina 201, localizada en el lazo que une los segmentos transmembranales S3 y S4 (Fig. 27, alineamiento 2; Wallner y col. 1996) tampoco afectó la pendiente de estas curvas (Tabla 1). Sin embargo, las

mutaciones R207Q, R207E, R210Q, R210N y R213Q produjeron una disminución de la pendiente de las curvas  $P_o$ -V de 49%, 50%, 51%, 65%, y 59%, respectivamente (Tabla 1). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los aminoácidos básicos del segmento S4 son parte del sensor de potencial en *hSlo*. Un método alternativo usado para calcular el número de cargas de compuerta es el "método de la pendiente límite" (MPL) (Almers, 1978). Los datos de  $P_o$  se grafican con la ordenada en forma logarítmica, en función del potencial (V), y la ecuación 27 se ajusta a los valores de  $P_o$  en el intervalo de 0,001 a 0,01 (Apéndice II):

$$P_o = A \cdot \exp [z_{eq}lim \cdot F \cdot V / (R \cdot T)] \quad (27)$$

donde  $A$  es una constante y  $z_{eq}lim$  es el número de cargas de compuerta. Los resultados obtenidos al aplicar el método a *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4 se detallan en la tercera columna de la Tabla 1. En general, el número de cargas de compuerta obtenido con el MPL ( $z_{eq}lim$ ) fue mayor que el obtenido con la distribución de Boltzmann ( $z_{eq}$ ). Es necesario recalcar el caso de las mutaciones R207Q y R207E, donde se encontraron las mayores diferencias. Para estos mutantes,  $z_{eq}lim$  no fue significativamente distinto del valor obtenido para *hSlo* WT. Así entonces, al usar el MPL se estableció que sólo la neutralización de las argininas 210 y 213 fue capaz de reducir significativamente el número de cargas de compuerta cuyo movimiento está acoplado a la apertura del canal (Tabla 1,  $P \leq 0,005$ ). En el caso del mutante Q216R el valor de  $z_{eq}$  fue similar al obtenido con el MPL. Sin embargo para este mutante  $z_{eq}lim$  fue significativamente menor que para *hSlo* WT (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de cargas de compuerta de *hSlo* silvestre y de los mutantes del segmento S4

Canal	$Z_{eq}^a$		$Z_{eq}^{lim}^b$	
Silvestre	1.43 ± 0.36	(31)	1.56 ± 0.21	(13)
R201Q	1.32 ± 0.16	(25)	---	
L204H	1.16 ± 0.54	(25)	---	
L204R	1.58 ± 0.28	(19)	---	
R207Q	0.73 ± 0.18*	(45)	1.38 ± 0.24	(19)
R207E	0.72 ± 0.15*	(19)	1.35 ± 0.27	(27)
R210Q	0.70 ± 0.16*	(6)	1.01 ± 0.29*	(6)
R210N	0.50 ± 0.16*	(7)	0.77 ± 0.18*	(9)
R213Q	0.58 ± 0.08*	(19)	0.85 ± 0.17*	(16)
Q216R	1.13 ± 0.25	(9)	1.25 ± 0.23*	(8)
E219Q	1.26 ± 0.19	(12)	1.56 ± 0.19	(12)
E219K	1.51 ± 0.32	(13)	1.42 ± 0.27	(10)
R207Q- R213Q	0.51 ± 0.06*	(20)	0.80 ± 0.17*	(17)

<sup>a</sup> Valores obtenidos del ajuste de una distribución de Boltzmann (ecuación 14) a las curvas de probabilidad del estado abierto en función del potencial. <sup>b</sup> Valores obtenidos con el método de la pendiente límite, MPL (ecuación 27). Los asteriscos (\*) indican los valores significativamente distintos al silvestre, con un nivel de significación de 0,5% ( $P \leq 0,005$ ).

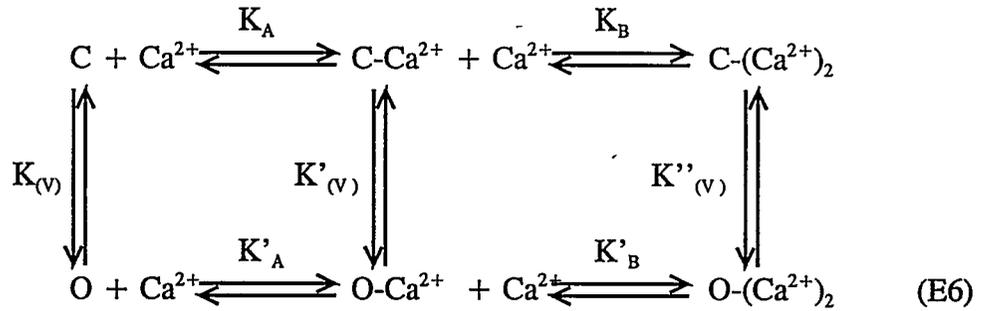
**Tabla 2.** Valores de  $V_{1/2}$  a las  $[Ca^{2+}]$  indicadas, para *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4

Canal	$V_{1/2}$ (mV) <sup>a</sup> (1.7 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )		$V_{1/2}$ (mV) <sup>a</sup> (10 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )		$V_{1/2}$ (mV) <sup>a</sup> (103 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )	
	Silvestre	86 $\pm$ 17	(36)	12 $\pm$ 18	(24)	-18 $\pm$ 33
R201Q			68 $\pm$ 26*	(10)		
L204H			11 $\pm$ 56	(10)		
L204R	92 $\pm$ 5	(3)				
R207Q	-104 $\pm$ 18*	(3)				
R207E			-178 $\pm$ 17*	(9)		
R210Q					100 $\pm$ 38*	(3)
R210N	54 $\pm$ 29	(5)				
R213Q					114 $\pm$ 13*	(4)
Q216R	124 $\pm$ 41	(2)				
E219Q	88 $\pm$ 23	(3)				
E219K	75 $\pm$ 10	(1)				
R207Q- R213Q					141 $\pm$ 12*	(4)

<sup>a</sup> Valores obtenidos del ajuste de una distribución de Boltzmann (ecuación 14) a las curvas de probabilidad del estado abierto en función del potencial. Los asteriscos (\*) indican los valores significativamente distintos al silvestre, con un nivel de significación de 0,5% ( $P \leq 0,005$ ).

### 3.4. Interpretación cuantitativa de los resultados sobre la base de un modelo simple.

Los resultados obtenidos con *hSlo* WT y con los diferentes mutantes estudiados pueden ser interpretados con un modelo de seis estados:



En este modelo el estado cerrado (C) o el estado abierto (O) del canal pueden unir hasta dos iones  $Ca^{2+}$  para generar canales cerrados o abiertos con un ion  $Ca^{2+}$  unido ( $C-Ca^{2+}$  y  $O-Ca^{2+}$ , respectivamente), o con dos iones  $Ca^{2+}$  unidos ( $C-(Ca^{2+})_2$  y  $O-(Ca^{2+})_2$ , respectivamente). Este esquema es una versión simplificada del modelo de activación para los canales  $K_{Ca}$  propuesto por Cox y col. (1997b). Los autores usaron una versión dependiente del potencial del modelo de Monod, Wyman y Changeux para proteínas alostéricas. En ella se considera que el canal  $K_{Ca}$  es una proteína homotetramérica con un sitio de unión a  $Ca^{2+}$  en cada subunidad. El equilibrio entre las dos conformaciones en que el canal puede existir (cerrado (C) o abierto (O)), con o sin  $Ca^{2+}$  unido, depende del potencial. Por esta razón, en ausencia de  $Ca^{2+}$  el canal puede abrirse en respuesta al potencial; en esta condición el equilibrio puede describirse por la siguiente expresión:

$$K_{(v)} = O / C = \exp [-(\Delta G_0' - z \cdot U)] \quad (28)$$

donde  $\Delta G_0' = \Delta G_0 / (R \cdot T)$  es la diferencia de energía libre entre el estado abierto (O) y el estado cerrado (C) en ausencia de potencial transmembranal y en unidades de  $(R \cdot T)$ ;  $z$  es el número de cargas de compuerta cuyo movimiento en el campo eléctrico está asociado a la activación del canal,  $U = F \cdot V / (R \cdot T)$ , es el potencial reducido, en que

$F$ ,  $R$  y  $T$  son la constante de Faraday, la constante de los gases y la temperatura absoluta respectivamente, y  $V$  el potencial de membrana.

La unión de un ion  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la apertura del canal reduciendo la diferencia de energía libre entre el estado cerrado y abierto. Así entonces, cuando el canal ha unido un ion  $\text{Ca}^{2+}$ , el equilibrio entre  $\text{C} \cdot \text{Ca}^{2+}$  y  $\text{O} \cdot \text{Ca}^{2+}$  queda definido por:

$$K'_{(v)} = \text{O} \cdot \text{Ca}^{2+} / \text{C} \cdot \text{Ca}^{2+} = \exp \{ - [(\Delta G_0' - A) - z \cdot U] \} \quad (29)$$

donde  $A$  ( $>0$ ) es la reducción de la diferencia de energía libre entre el cerrado y el abierto, inducida por la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al estado cerrado se puede describir con la siguiente expresión:

$$K_A = \text{C} \cdot \text{Ca}^{2+} / \text{C} = [\text{Ca}^{2+}] / K_{DA} \quad (30)$$

donde  $K_{DA}$  es la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  del canal en el estado cerrado. Como condición del principio de reversibilidad microscópica, debe cumplirse la siguiente relación:

$$K_{(v)} \cdot K'_A = K_A \cdot K'_{(v)} \quad (31)$$

Como consecuencia, la constante  $K'_A$  queda definida por las otras tres y equivale a:

$$K'_A = K_A \cdot K'_{(v)} / K_{(v)} \quad (31a)$$

$$K'_A = \{ [\text{Ca}^{2+}] / K_{DA} \} \cdot \exp(A) = [\text{Ca}^{2+}] / [K_{DA} \cdot \exp(-A)] \quad (32)$$

La ecuación (32) significa que la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  al canal abierto es menor en un factor igual a  $\exp(-A)$  a la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  al canal cerrado; en otras palabras, la mayor afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$  por el estado abierto estabiliza al canal en esta conformación.

La unión de un segundo ion  $\text{Ca}^{2+}$  al canal reduce adicionalmente la diferencia de energía libre entre  $C$  y  $O$ , estabilizando aun más a este último estado. Es así que cuando el canal ha unido dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  el equilibrio entre el estado abierto y el cerrado queda definido por:

$$K''_{(v)} = O-(\text{Ca}^{2+})_2 / C-(\text{Ca}^{2+})_2 = \exp \{ - [(\Delta G_0' - A - B) - z \cdot U] \} \quad (33)$$

En este caso,  $B$  es la reducción adicional del  $\Delta G_0'$  aportada por la unión del segundo ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión del segundo ion  $\text{Ca}^{2+}$  al estado cerrado se describe con la ecuación (34):

$$K_B = C-(\text{Ca}^{2+})_2 / C-\text{Ca}^{2+} = [\text{Ca}^{2+}] / K_{DB} \quad (34)$$

donde  $K_{DB}$  es la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  al segundo sitio del canal, en el estado cerrado. Por un razonamiento análogo al discutido anteriormente, la constante  $K'_B$  queda definida como:

$$K'_B = \{ [\text{Ca}^{2+}] / K_{DB} \} \cdot \exp (B) = [\text{Ca}^{2+}] / [K_{DB} \cdot \exp (-B)] \quad (35)$$

significando que la constante de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  al sitio B del canal abierto es menor en un factor igual a  $\exp (-B)$  a la constante de disociación del segundo ion  $\text{Ca}^{2+}$  al canal cerrado.

La probabilidad del estado abierto,  $P_O$ , para el modelo está dada por:

$$P_O = \frac{1}{1 + \frac{[1 + K_A \cdot (1 + K_B)] \cdot K_{(v)}^{-1}}{[1 + K'_A \cdot (1 + K'_B)]}} \quad (36)$$

Si definimos:

$$M = [1 + K_A \cdot (1 + K_B)] / [1 + K'_A \cdot (1 + K'_B)] \quad (36a)$$

la ecuación (36) se puede reescribir como:

$$P_o = 1 / (1 + M \cdot K_{(v)}^{-1}) \quad (36b)$$

Podemos ver entonces que la dependencia del  $Ca^{2+}$  de la  $P_o$  queda contenida en el término  $M$ , mientras que la constante  $K_{(v)}^{-1}$  contiene la dependencia del potencial, determinando la pendiente de la curva  $P_o$ - $V$ .

### 3.4.1. Características del modelo de activación: casos particulares.

Las características básicas del modelo se pueden observar en la figura 32. Las curvas  $P_o$ - $V$  tienen una forma sigmoidea, cuya pendiente está determinada por  $z$  (Fig. 32A). La posición de las curvas en el eje de potencial depende del término  $M$  (ecuaciones 36 y 36b), es decir de las constantes  $K_A$ ,  $K'_A$ ,  $K_B$  y  $K'_B$ . Cuando la  $[Ca^{2+}]$  tiende a 0,  $K_A$ ,  $K'_A$ ,  $K_B$  y  $K'_B$  tienden a 0 (ecuaciones 30, 32, 34 y 35). En este caso la expresión para la  $P_o$  se reduce a:

$$P_o = 1 / (1 + K_{(v)}^{-1}) = 1 / [1 + \exp (\Delta G_o' - z \cdot U)] \quad (37)$$

Así entonces, la posición de las curvas en el eje de potencial queda determinada solamente por  $\Delta G_o'$ . (Fig. 32B y D). Cuando la  $[Ca^{2+}]$  aumenta haciéndose apreciable respecto de las constantes de disociación, las curvas se desplazan hacia la izquierda en el eje de potencial (Fig. 32B); este desplazamiento se satura cuando la  $[Ca^{2+}]^2 \gg K_{DA} \cdot K_{DB}$ , pues en esta condición el término  $M$  (ecuaciones 36a y 36b) tiende a  $\exp [-(A+B)]$  y la expresión para la  $P_o$  se reduce a:

$$P_o = 1 / \{1 + \exp [(\Delta G_o' - A - B) - z \cdot U]\} \quad (38)$$

La expresión de los datos en términos del potencial al cual se alcanza el 50% de la conductancia máxima ( $V_{1/2}$ ) en función del logaritmo de la  $[Ca^{2+}]$  (curva  $V_{1/2} - [Ca^{2+}]$ ), permite discernir gráficamente cuales son los parámetros que se modifican cuando se hace una manipulación del canal. Cuando la conductancia es un 50% de la  $G_{max}$  ( $P_o = 0,5$ ),  $V$  es igual a  $V_{1/2}$ , y la ecuación 36 se reduce a:

$$\{[1 + K_A \cdot (1 + K_B)] / [1 + K'_A \cdot (1 + K'_B)]\} \cdot K_{(V)}^{-1} = 1 \quad (39)$$

$$M \cdot K_{(V)}^{-1} = 1 \quad (39a)$$

donde  $K_{(V)}^{-1} = \exp (\Delta G_o' - z \cdot U_{1/2})$  y  $U_{1/2} = F \cdot V_{1/2} / (R \cdot T)$ . Al tomar el logaritmo natural, tenemos:

$$\ln (M) + \Delta G_o' - z \cdot F \cdot V_{1/2} / (R \cdot T) = 0 \quad (40)$$

y reordenando:

$$V_{1/2} = [(R \cdot T) / (z \cdot F)] \cdot \{\Delta G_o' + \ln (M)\} \quad (41)$$

Escribiendo explícitamente  $M$ , la expresión de  $V_{1/2}$  se expande a:

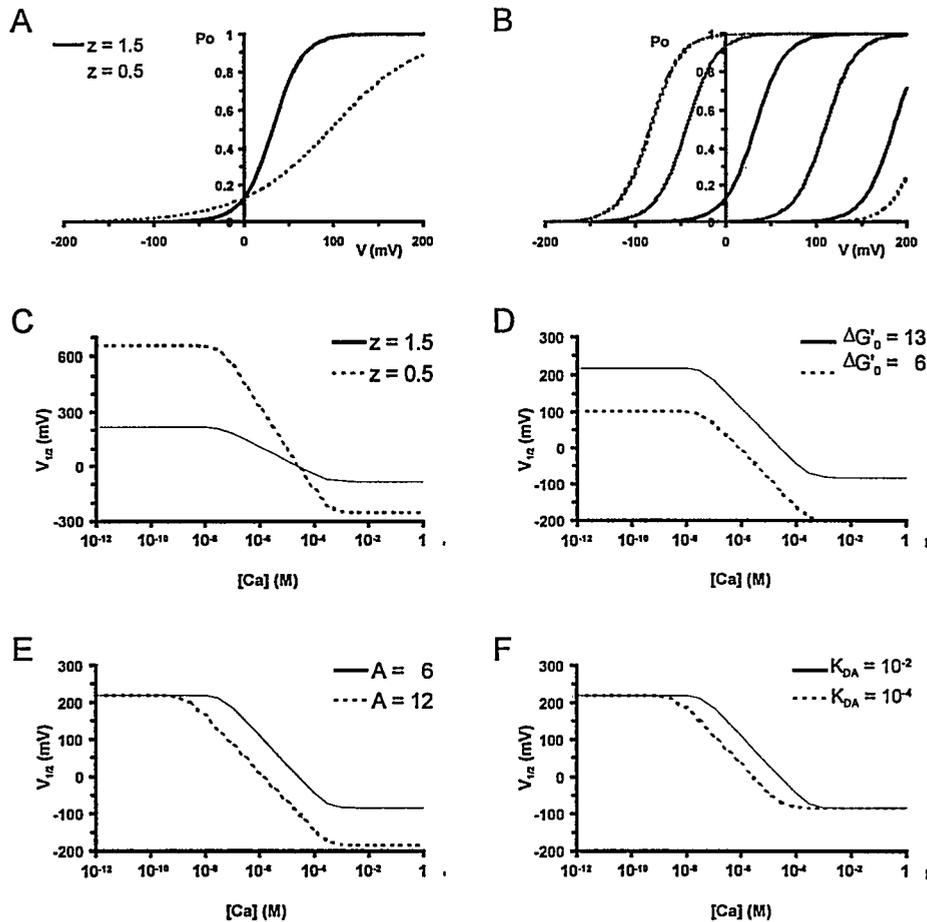
$$V_{1/2} = [(R \cdot T) / (z \cdot F)] \cdot \{ \Delta G_o' + \ln \{ [1 + [Ca^{2+}] / K_{DA} + [Ca^{2+}]^2 / (K_{DA} \cdot K_{DB})] / [1 + [Ca^{2+}] \cdot \exp(A) / K_{DA} + [Ca^{2+}]^2 \cdot \exp(A + B) / (K_{DA} \cdot K_{DB})] \} \} \quad (41a)$$

En la figura 32 (C-F) se puede observar el comportamiento de la curva  $V_{1/2} - [Ca^{2+}]$  cuando se modifican los parámetros  $z$ ,  $A$ ,  $K_{DA}$ , o  $\Delta G_o'$ . Cuando se reduce el número de cargas de compuerta,  $z$ , la pendiente de la curva  $V_{1/2} - [Ca^{2+}]$  aumenta en el intervalo de  $[Ca^{2+}]$  donde el  $V_{1/2}$  depende del  $Ca^{2+}$ , y el valor de  $V_{1/2}$  crece para

concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  tendientes a 0, o decrece si la  $[\text{Ca}^{2+}] \gg K_{DA} \cdot K_{DB}$  (Fig. 32C). Una disminución en la diferencia de energía libre entre los estados cerrados y abiertos ( $\Delta G_0$ ) produce un desplazamiento de la curva  $V_{1/2} - [\text{Ca}^{2+}]$  hacia potenciales hiperpolarizados, en todo el intervalo de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Fig. 32D). Por otro lado, un aumento del parámetro  $A$ , produce un incremento del desplazamiento del  $V_{1/2}$  con el  $\text{Ca}^{2+}$ , alcanzando a  $[\text{Ca}^{2+}]$  altas un valor de  $V_{1/2}$ . Un efecto análogo se obtiene al modificar el parámetro  $B$  (no mostrado). Por último, cuando la  $K_{DA}$  disminuye, la curva se desplaza en el eje del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia  $[\text{Ca}^{2+}]$  menores. Para una misma magnitud de cambio en  $K_{DB}$ , se obtiene un desplazamiento equivalente de la curva. Estos desplazamientos son aditivos (no mostrado).

La ecuación 41 permite visualizar en una sola representación gráfica, las curvas de  $V_{1/2}$  en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , los parámetros que son modificados por las diferentes mutaciones, en términos de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{DA} \cdot K_{DB}$ ), la energética del canal ( $\Delta G_0$ ), y la dependencia del voltaje ( $z$ ). Las curvas de  $V_{1/2}$  en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  para los canales mutantes del segmento S4 se comparan con la curva de *hSlo* WT en la figura 33. Un resultado común para los distintos mutantes es el descrito para *hSlo* WT en la figura 25: el  $V_{1/2}$  depende de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cuando ésta es mayor que  $\approx 100$  nM. Bajo este nivel de  $\text{Ca}^{2+}$ , cambios en la concentración del catión son incapaces de modificar el  $V_{1/2}$  de los canales mutados en el segmento S4 (Fig. 33).

Los datos de  $V_{1/2}$  en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  para *hSlo* WT pudieron ser razonablemente ajustados con la ecuación 41, indicando que nuestro modelo simple en



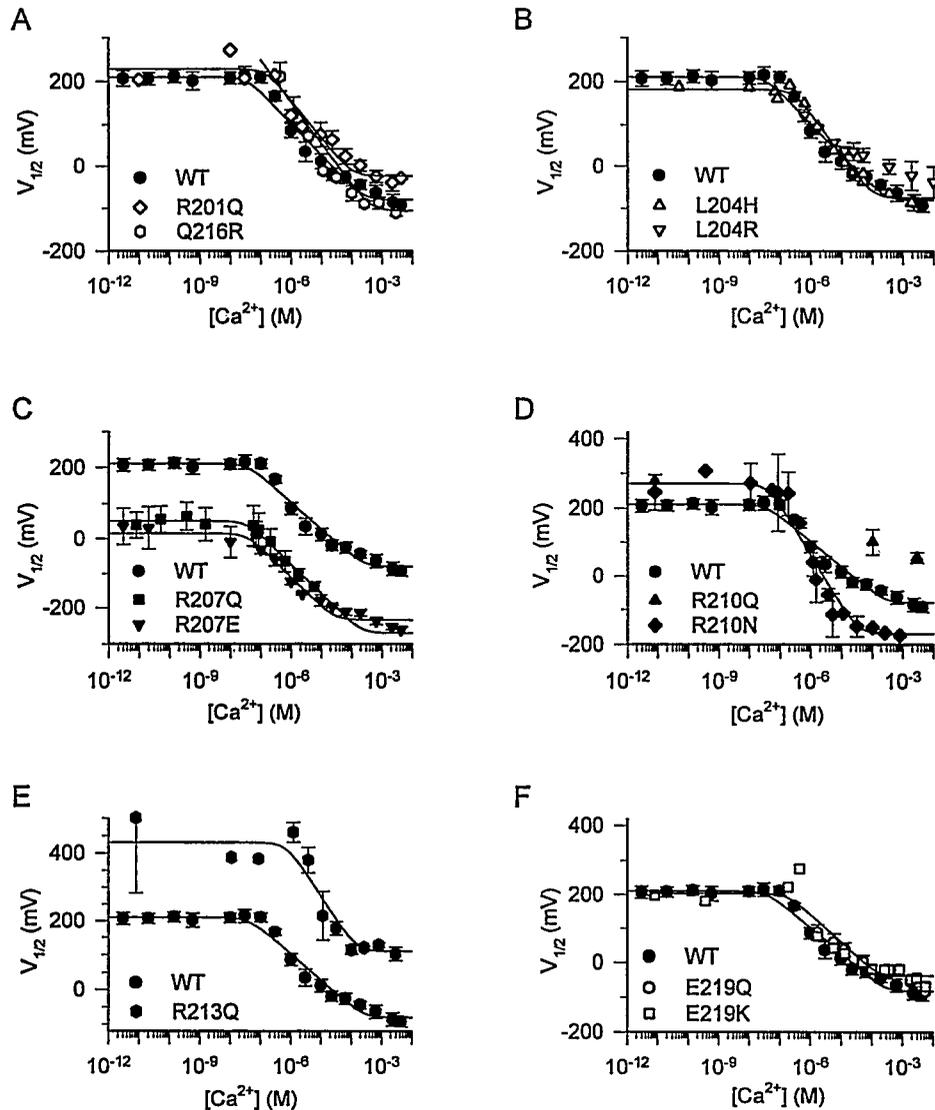
**Figura 32.** Características del modelo propuesto para la activación de *hSlo*.

**A.** Curvas de probabilidad del estado abierto ( $P_o$ ) en función del potencial (curvas  $P_o$ - $V$ ). Las curvas se simularon con la ecuación 36 para valores de  $z = 1,5$  y  $0,5$ . Los parámetros restantes fueron:  $\Delta G'_0 = 13$ ,  $A = 6$ ,  $B = 12$ ,  $K_{DA} = 10^2$  y  $K_{DB} = 10^5$ . **B.** Curvas  $P_o$ - $V$  simuladas para  $[Ca^{2+}]$  entre 1 pM y 1 M. Las líneas punteadas en el cuadrante derecho del gráfico corresponden a las curvas obtenidas con  $[Ca^{2+}]$  entre 1 pM y 100 nM, mientras que las ubicadas en el cuadrante izquierdo fueron obtenidas con  $[Ca^{2+}]$  entre 1 mM y 1 M. A medida que la concentración aumenta desde 100 nM hasta 1 mM las curvas se desplazan desde potenciales despolarizados a potenciales hiperpolarizados. **C - F.** Curvas de  $V_{1/2}$  en función del logaritmo de la  $[Ca^{2+}]$ , simuladas con la ecuación 41. **C.** Curvas obtenidas para valores de  $z = 1,5$  (—) y  $0,5$  (- -). Los parámetros restantes fueron los mismos que en A. **D.** Curvas obtenidas para valores de  $\Delta G'_0 = 13$  (—) y  $6$  (- -). Los parámetros restantes fueron:  $z = 1,5$ ,  $A = 6$ ,  $B = 12$ ,  $K_{DA} = 10^2$  y  $K_{DB} = 10^5$ . **E.** Curvas obtenidas para valores de  $A = 6$  (—) y  $12$  (- -). Los parámetros restantes fueron:  $z = 1,5$ ,  $\Delta G'_0 = 13$ ,  $B = 12$ ,  $K_{DA} = 10^2$  y  $K_{DB} = 10^5$ . **F.** Curvas obtenidas para valores de  $K_{DA} = 10^2$  (—) y  $10^4$  (- -). Los parámetros restantes fueron:  $z = 1,5$ ,  $\Delta G'_0 = 13$ ,  $A = 6$ ,  $B = 12$  y  $K_{DB} = 10^5$ .

que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y los cambios de conformación dependientes del potencial están separados, es capaz de describir esta conducta. Por lo tanto, el modelo fue ajustado también a los resultados obtenidos con los canales mutados en el segmento S4 (Fig. 33).

3.4.2. *Las modificaciones de la activación de hSlo inducidas por las mutaciones del segmento S4, pueden ser explicadas por cambios en  $\Delta G_0$  y  $z$ .*

El ajuste del modelo a los datos se realizó con la ecuación 41. En ella podemos ver que el  $V_{1/2}$  está relacionado con  $z_{eq}$ . Por esta razón al ajustar el modelo el parámetro  $z_{eq}$  se mantuvo fijo e igual al valor de  $z_{eq}$  límite, que aparece en la tercera columna de la Tabla 1. Como se mencionó anteriormente, las mutaciones R207Q, R207E, R210Q, R210N y R213Q producen corrimientos pronunciados en las curvas  $P_0$ -V (Fig. 30). En el caso de las mutaciones R207Q y R207E, el desplazamiento es de aproximadamente 150 mV e independiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Así entonces, en el gráfico  $V_{1/2}$ - $[\text{Ca}^{2+}]$  las curvas para estos mutantes se encuentran desplazadas hacia potenciales hiperpolarizados en forma paralela respecto de la curva de  $V_{1/2}$  de hSlo silvestre. El ajuste de la ecuación 41 a los datos indica que estas mutaciones modifican principalmente el parámetro  $\Delta G_0$  (Fig. 32D y 33C), con modificaciones menores de los otros parámetros (Tabla 3). Por otro lado, las mutaciones R210Q y R213Q produjeron una disminución del número de cargas de compuerta (Tabla 1) y desplazaron las curvas de activación hacia potenciales despolarizados (Fig. 30B, 33D y E). La baja probabilidad del estado abierto de estos mutantes hizo difícil la determinación del  $V_{1/2}$



**Figura 33.** Dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  del potencial de activación media,  $V_{1/2}$ , para *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4.

El potencial al cual se alcanza el 50% de la conductancia máxima,  $V_{1/2}$ , se obtuvo del ajuste de una distribución de Boltzmann a las curvas de probabilidad normalizada del estado abierto en función del potencial (Figs. 30 y 31) y se graficó en función de las correspondientes  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación 41 a los datos. La curva de  $V_{1/2}$  en función del  $\text{Ca}^{2+}$  para *hSlo* silvestre (WT) se compara con las correspondientes a los mutantes: R201Q y Q216R (A), L204H y L204R (B), R207Q y R207E (C), R210Q y R210N (D), R213Q (E), E219Q y E219K (F). Las barras representan la desviación estándar de 2 a 10 determinaciones. En B se muestra solo un experimento para L204H. En E los puntos para E219K corresponden a tres experimentos que cubrieron intervalos de  $[\text{Ca}^{2+}]$  sin superposición.

con  $[Ca^{2+}]$  menores que  $1 \mu M$ . Nuestro modelo predice que una disminución del número de cargas de compuerta inducirá un aumento de la pendiente de la curva de  $V_{1/2}$  en función de la  $[Ca^{2+}]$  (Fig. 32C). Esto es exactamente lo que se observó con el mutante R213Q. El ajuste del modelo se logró reduciendo el parámetro  $A$ , la disminución de la diferencia de energía libre entre el estado cerrado y el abierto, inducida por la unión de  $Ca^{2+}$ . En el caso del mutante R210N, tanto las curvas  $P_O-V$  (Fig. 30C) como la dependencia incrementada del  $V_{1/2}$  respecto del  $Ca^{2+}$  (Fig. 33D) indican que la mutación produce una disminución de  $z_{eq}$ . El mejor ajuste se logró con un reducción de  $\Delta G_0$  y de  $A$ , y un incremento leve de  $B$  (Tabla 3). Notablemente se observó también una reducción en  $K_{DA}$ . Para el resto de las mutaciones en que se realizó el ajuste (R201Q, L204H, Q216R y E219K), y en concordancia con las variaciones menores encontradas experimentalmente (Fig. 33A, B y F) los parámetros obtenidos no presentaron cambios notables respecto de *hSlo* silvestre (Tabla 3).

### 3.5. Mutaciones dobles y triples del segmento S4: expresión funcional y características electrofisiológicas de los mutantes.

Todas las mutaciones únicas del segmento S4 estudiadas en esta tesis, produjeron canales funcionales. Este resultado contrasta con el obtenido de los mutantes del segmento S4 del canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker*. En este canal, la neutralización de la lisina 374 y de la arginina 377 produjeron canales no funcionales (Papazian y col. 1991; Perozo y col. 1994; Papazian y col. 1995). En

*hSlo* estos residuos no están conservados respecto a *Shaker*, y corresponden a la glutamina 216 y al glutámico 219 (Fig. 27, alineamiento 2). Las mutaciones probadas en estas posiciones no suprimieron la expresión funcional de *hSlo* y produjeron sólo

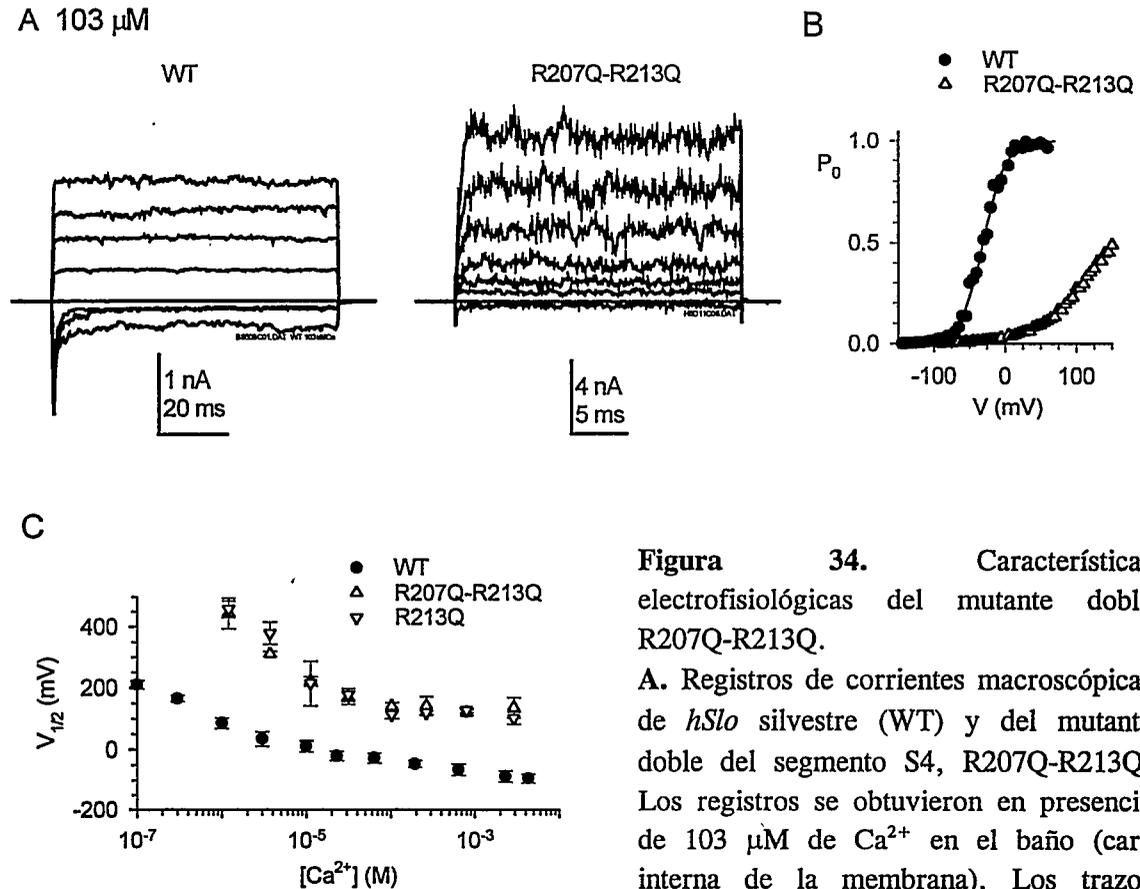
**Tabla 3.** Parámetros de ajuste del modelo de activación a las curvas de  $V_{1/2}$  en función de la  $[Ca^{2+}]$ , para *hSlo* silvestre y los mutantes del segmento S4.

Canal	$\Delta G_0^\ddagger$	$A^\ddagger$	$B^\ddagger$	$K_{DA}^\#$	$K_{DB}^\#$
WT	12,9	5,7	12.2	$8,7 \cdot 10^{-3}$	$8.6 \cdot 10^{-6}$
R201Q	11,9 (0,92)	5,1 (0,89)	8.1 (0,66)	$6,2 \cdot 10^{-3}$ (-0,15)	$1.9 \cdot 10^{-6}$ (-0,66)
L204H	8,3 (0,64)	3,7 (0,65)	8.0 (0,66)	$3,4 \cdot 10^{-3}$ (0,41)	$3.1 \cdot 10^{-6}$ (1,09)
R207Q	2,8 (0,21)	5,6 (0,99)	11.8 (0,97)	$8,7 \cdot 10^{-3}$ (0,00)	$4.8 \cdot 10^{-6}$ (-0,44)
R207E	0,8 (0,06)	4,0 (0,71)	9.2 (0,75)	$2,8 \cdot 10^{-4}$ (-1,49)	$2.4 \cdot 10^{-6}$ (-0,55)
R210N	8,2 (0,63)	0,4 (0,07)	13,0 (1,06)	$1,4 \cdot 10^{-3}$ (-0,80)	$8,3 \cdot 10^{-7}$ (-1,01)
R213Q	14,4 (1,12)	0,4 (0,08)	10.3 (0,85)	$2,9 \cdot 10^{-2}$ (0,52)	$8.2 \cdot 10^{-7}$ (-1,02)
Q216R	15,9 (1,24)	5,5 (0,97)	15.4 (1,27)	$2,0 \cdot 10^{-2}$ (0,36)	$9.8 \cdot 10^{-6}$ (0,06)
E219K	11,4 (0,88)	2,0 (0,35)	11.5 (0,94)	$2,2 \cdot 10^{-2}$ (0,40)	$1.0 \cdot 10^{-6}$ (-0,93)

Los parámetros se obtuvieron del ajuste de la ecuación 41 a las curvas de  $V_{1/2}$  en función del  $[Ca^{2+}]$  (Fig. 33), usando los valores de  $z_{eq}$  de la Tabla 1.  $^\ddagger$  Entre paréntesis se indica la razón del valor obtenido para el mutante en relación al valor obtenido para *hSlo* silvestre (WT).  $^\#$  Entre paréntesis se indica el logaritmo de la razón entre el valor obtenido para el mutante en relación al valor obtenido para *hSlo* silvestre (WT).

alteraciones menores en la activación de *hSlo* (ver sección anterior). Estos resultados sugieren que la estructura del segmento S4 de *hSlo* y/o la de los dominios vecinos, están configuradas de manera diferente en estos canales.

Con el objetivo de probar si la neutralización de más de uno de los residuos conservados cargados positivamente tenía un efecto aditivo en la reducción de la carga de compuerta, se realizaron mutaciones dobles del segmento S4 de *hSlo*. Cuando las argininas conservadas 207 y 213 se neutralizaron mutándolas por glutamina, el mutante doble generado, R207Q-R213Q, se expresó a niveles comparables con los otros mutantes ya descritos. Las características generales de éste se pueden observar en la figura 34. En relación al silvestre, la activación del mutante R207Q-R213Q está desplazada notablemente hacia potenciales despolarizantes: cuando la  $[Ca^{2+}]$  es 103  $\mu M$ , se necesitan pulsos despolarizantes  $\geq 80$  mV para inducir corrientes en el mutante mientras que en *hSlo* WT las corrientes pueden ser activadas por potenciales negativos (Fig. 34A). Esto tiene como consecuencia que a 0 mV la  $P_o$  de los canales R207Q-R213Q es casi nula mientras que la  $P_o$  de *hSlo* WT es cercana al máximo (Fig. 34B). En este sentido el mutante doble es similar al mutante R213Q, cuya curva de activación también está desplazada hacia potenciales positivos (Fig. 30B). El resultado indica que el efecto inducido por la neutralización de las argininas 207 y 213 en la diferencia de energía libre entre los estados cerrados y abiertos, ( $\Delta G_o$ ), no es aditivo.



**Figura 34.** Características electrofisiológicas del mutante doble R207Q-R213Q.

A. Registros de corrientes macroscópicas de *hSlo* silvestre (WT) y del mutante doble del segmento S4, R207Q-R213Q. Los registros se obtuvieron en presencia de 103  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño (cara interna de la membrana). Los trazos corresponden a las corrientes inducidas

por estímulos de -150, -100 y -50 mV y de 0 a 80 mV cada 20 mV para *hSlo* WT y de -100 y 0 mV y de 40 a 140 mV cada 20 mV para R207Q-R213Q. B. Curvas de probabilidad normalizada del estado abierto en función del potencial para *hSlo* WT y el mutante indicado, obtenidas de los datos mostrados en A. La línea continua es el ajuste de una distribución de Boltzmann a los datos con los siguientes parámetros de ajuste: WT:  $V_{1/2} = -31$  mV,  $z_{\text{eq}} = 1,59$ ; R207Q-R213Q:  $V_{1/2} = 149$  mV,  $z_{\text{eq}} = 0,57$ . C. Curvas de  $V_{1/2}$  en función del logaritmo de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  para *hSlo* WT y los mutantes R207Q-R213Q y R213Q.

En cuanto a la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del parámetro  $V_{1/2}$ , (Fig. 34C), podemos observar que la curva del mutante doble está desplazada hacia potenciales despolarizantes respecto a *hSlo* WT, en todo el intervalo de  $[\text{Ca}^{2+}]$  explorado. Notablemente, la curva

de  $V_{1/2}$  de R207Q-R213Q es prácticamente indistinguible de la del mutante R213Q (Fig. 34C).

Como se observa en la figura 34B, la dependencia del potencial del mutante R207Q-R213Q es menor que la *hSlo* WT. De la misma forma que con los mutantes simples R207Q y R213Q, el número de cargas de compuerta obtenido del ajuste de la distribución de Boltzmann ( $z_{eq}$ ) a las curvas  $P_o$ -V para R207Q-R213Q, fue significativamente menor que  $z_{eq}$  de *hSlo* WT ( $P \leq 0.005$ , Tabla 1, segunda columna). Por otro lado, cuando el parámetro se computó con el método de la pendiente límite ( $z_{eq}^{lim}$ ), el valor fue significativamente menor que el de *hSlo* WT y similar al del mutante R213Q ( $P \leq 0.005$ , Tabla 1, tercera columna). Este resultado concuerda con los obtenidos con los correspondientes mutantes simples, pues  $z_{eq}^{lim}$  del mutante R213Q fue también significativamente menor que el de *hSlo* silvestre.

### 3.5.1. Mutaciones del segmento S4 que reducen o suprimen la expresión de *hSlo*.

De las mutaciones dobles o triples probadas electrofisiológicamente, la mutación R207Q-R213Q fue la única que produjo canales con la capacidad de conducir corrientes iónicas (Fig. 34). Se construyó entonces un mutante doble en que las argininas 210 y 213 se mutaron por los aminoácidos neutros asparragina y glutamina respectivamente. Notablemente, esta mutación doble (R210N-R213Q) suprimió la capacidad de los canales de conducir corrientes iónicas. Este resultado fue observado

en un total de 13 sellos hechos en 11 oocitos de *Xenopus l.* provenientes de dos ejemplares distintos. La inyección de una cantidad equivalente de RNA de *hSlo* silvestre en uno de estos grupos de oocitos, indujo corrientes cuya magnitud saturó el sistema de registro (no mostrado).

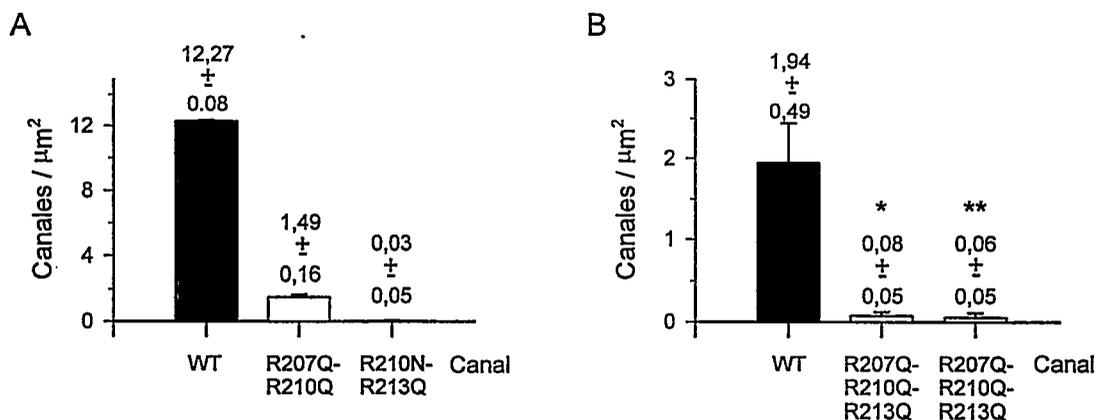
Un resultado similar se obtuvo con un mutante triple en que las tres argininas conservadas del segmento S4 (R207, R210 y R213) fueron mutadas por glutamina (R207Q-R210Q-R213Q). En este caso, la carencia de corrientes iónicas asociada a al mutante triple se verificó en 27 sellos hechos en 11 oocitos provenientes de 3 ejemplares distintos.

La incapacidad de estos mutantes de expresar corrientes iónicas puede ser explicada, en principio de dos maneras: i. Los canales mutados se insertan normalmente en la membrana citoplasmática del oocito, pero la mutación hecha en el segmento S4 impide la activación del canal en respuesta a un estímulo de potencial; ii. los canales mutados no llegan a insertarse en la membrana. Resultados obtenidos con el canal *Shaker*, respaldan la segunda alternativa. La supresión de las corrientes iónicas inducida por las mutaciones K374Q y R377Q en este canal, está asociada a la desaparición de la forma madura de alto peso molecular de la proteína *Shaker*. Adicionalmente, estas mutaciones inducen la acumulación de una forma de bajo peso molecular, característica de la forma inmadura, parcialmente glicosilada, de la proteína (Perozo y col. 1994). Esto llevó a proponer que las proteínas mutadas podrían plegarse incorrectamente, suprimiendo la transferencia normal entre los compartimentos

membranosos intracelulares y el transporte de los canales hacia la superficie celular (Perozo y col. 1994).

Para probar si las mutaciones que suprimen la expresión de las corrientes iónicas *hSlo* se correlacionan con la ausencia de los canales en la superficie de los oocitos, se realizaron experimentos de unión de una toxina específica para los canales  $K_{Ca}$ , la iberiotoxina (IbTX) (Galvez y col. 1990), a oocitos inyectados con RNA de *hSlo* silvestre o de los mutantes en estudio. La IbTX es un péptido que bloquea la conducción de corriente al unirse a la boca externa del canal, con un mecanismo de reacción bimolecular (Candia y col. 1992; Giangiacomo y col. 1992). Tomando en cuenta esta característica y que el equilibrio de la unión de la toxina se alcanza en el lapso de horas, la toxina es una herramienta especialmente adecuada para contar el número de canales presentes en la membrana. Los oocitos se microinyectaron con RNA de *hSlo* silvestre (WT) o de los mutantes R210N-R213Q, R207Q-R210Q o R207Q-R210Q-R213 y se incubaron durante un período que normalmente permite la expresión de las corrientes iónicas. Posteriormente, se incubaron por doce horas con la toxina radiyodada [ $^{125}$ I]IbTX-D19Y/Y36F (Koschak y col. 1997). La actividad de esta versión mutada de la toxina, como también la de la especie radiyodada, es indistinguible de la IbTX silvestre (Koschak y col. 1997). Luego de un procedimiento de lavado del exceso de toxina se determinó la toxina unida a los oocitos en un contador *gamma*. Los resultados de estos ensayos se observan en la figura 35. En un experimento se midió la toxina unida a oocitos inyectados con RNA de los mutantes dobles R210N-R213Q y R207Q-R210Q y se comparó con la toxina unida a oocitos que

se encontraban expresando *hSlo* WT (Fig. 35A). En la figura se puede ver que con la mutación R207Q-R210Q redujo ocho veces el número de sitios de unión para la IbTX, en relación a *hSlo* WT. Por otro lado, la mutación R210N-R213Q suprimió totalmente los sitios de unión para la toxina. Este resultado sugiere que la carencia de corrientes iónicas observada con el mutante R210N-R213Q se debe a que la mutación suprime la llegada de los canales a la membrana citoplasmática del oocito.



**Figura 35.** La supresión de corrientes iónicas inducida por las mutaciones del segmento S4 de *hSlo* se correlaciona con una ausencia de sitios de unión para la iberiotoxina.

Los oocitos se microinyectaron con RNA de *hSlo* silvestre (WT) o de los mutantes del segmento S4 según se indica en la figura. Luego de 3 días (A) o 4 días (B) los oocitos se incubaron durante doce horas con iberiotoxina [<sup>125</sup>I]IbTX-D19Y/Y36F. La unión inespecífica se determinó en oocitos no microinyectados y se sustrajo de los datos experimentales. El número de canales por oocito se determinó a partir del número de moles de toxina unida. Este valor se corrigió por la inhibición de la unión inducida por el ion Na<sup>+</sup> (Koschak y col. 1997), suponiendo una inhibición competitiva (ecuación 9; Métodos). La densidad de canales se calculó a partir de una estimación del área de la superficie del oocito con medidas de capacidad. **A.** Los oocitos se inyectaron con 5 ngr de RNA de las especies indicadas. Sobre cada barra se indica la densidad de canales ± la desviación estándar de 8 (WT), 10 (R210N-R213Q) y 10 (R207Q-R210Q) determinaciones. **B.** Los oocitos se inyectaron con 5 ngr de RNA de *hSlo* WT (n = 2) o con 125 (\*; n = 11) o 50 (\*\*; n = 8) ngr de RNA del mutante triple R207Q-R210Q-R213Q, proveniente de dos transcripciones distintas.

Un resultado similar se encontró con el mutante triple R207Q-R210Q-R213Q (Fig.35B). En este experimento los oocitos se microinyectaron con dos preparaciones de RNA provenientes de reacciones de transcripción independientes. La cantidad de RNA inyectado del mutante triple fue 25 y 10 veces mayor que la usada para *hSlo* WT (Fig.35B, \* y \*\*, respectivamente). El número de sitios para la IbTX expresados con *hSlo* WT en este experimento fue menor que en el experimento descrito en la parte A. La carencia de expresión de corrientes iónicas para este mutante junto al exceso de RNA inyectado y los orígenes distintos del RNA usado sugieren fuertemente que el mutante triple no llega a la membrana citoplasmática del oocito.

Los resultados descritos indican que cuando las argininas 210 y 213 se neutralizan simultáneamente (mutaciones R210N-R213Q y R207Q-R210Q-R213Q) la expresión funcional de las corrientes iónicas y de los canales en la membrana se suprime. Sin embargo, aquellos mutantes en que sólo uno de estos residuos se neutraliza son capaces de expresarse en la membrana. Entre éstos se cuentan los mutantes simples R210Q, R210N y R213Q, y los mutantes dobles R207Q-R213Q y R207Q-R210Q. Al momento de empezar la escritura de esta tesis no se contó con la caracterización de las corrientes iónicas de este último mutante.

## DISCUSIÓN

Uno de los rasgos que definen a los canales de  $K^+$  de gran conductancia, dependientes de  $Ca^{2+}$ , es que el tiempo que el canal permanece en el estado conductor ( $P_o$ ) aumenta como consecuencia de la despolarización de la membrana y/o de un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  interno. (Blatz y Magleby 1987; Latorre y col. 1989). En esta tesis se caracterizó la dependencia del voltaje de la activación del canal  $K_{Ca}$  clonado del miometrio humano, *hSlo*, (Wallner y col. 1995), expresado en oocitos de *Xenopus laevis*.

Los resultados obtenidos indican que el canal *hSlo* posee un sensor intrínseco del potencial eléctrico transmembranal. Este sensor está formado, al menos en parte, por dos de los aminoácidos conservados con carga positiva del segmento transmembranal S4, las argininas 210 y 213. Los resultados indican además que la corriente puede ser bloqueada por el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en la solución interna, simulando una inactivación. Se puede descartar entonces la existencia de un proceso de inactivación dependiente del potencial en *hSlo*.

1. *Los canales hSlo expresados en oocitos de Xenopus laevis conservan los rasgos típicos de los canales  $K_{Ca}$ .*

Las características de los canales *hSlo* expresados en este sistema, concuerdan con aquellas descritas para los canales nativos. La dependencia del potencial de *hSlo* corresponde a un cambio de  $e$  veces en la  $P_o$  cada  $\approx 18$  mV. Este valor está comprendido en el intervalo de  $e$  veces cada 8 a 39 mV, reportado en la literatura (Latorre, 1994). Originalmente se describió que la activación de los canales  $K_{Ca}$  era totalmente dependiente de la presencia de  $Ca^{2+}$  en el medio interno (Latorre y col. 1989; McManus 1991). Esta visión ha sido profundamente modificada por los resultados que indican que los canales  $K_{Ca}$  se pueden activar en respuesta a estímulos de potencial en forma independiente de la  $[Ca^{2+}]$ , en el intervalo comprendido entre 10 picomolar y 100 nanomolar (Meera y col. 1996; Cui y col. 1997; esta tesis). La relación entre la  $P_o$  de los canales  $K_{Ca}$  y la  $[Ca^{2+}]$ , se puede describir con la ecuación de Hill (McManus 1991). La  $[Ca^{2+}]$  necesaria para alcanzar una  $P_o = 0,5$  a 0 mV ( $K$ ) es 45  $\mu$ M en el caso de *hSlo*, con un coeficiente de Hill de 0,7. Los valores de estos parámetros están también dentro de los límites descritos para los canales  $K_{Ca}$  (McManus 1991; Wallner y col. 1995).

2. *El  $Ba^{2+}$  contaminante causa la inhibición de la corriente observada con potenciales despolarizantes.*

En la sección 2 del capítulo de Resultados se muestra que cuando los canales *hSlo* son activados por pulsos despolarizantes, las corrientes alcanzan un máximo y luego decaen. Esta no es una característica compartida por la mayoría de los canales  $K_{Ca}$ , pues una vez que estos alcanzan la conformación conductora, son capaces de conducir corriente durante todo el lapso en que el estímulo activador está presente (Latorre y col. 1989; Blatz y Magleby 1987). El decaimiento observado en las corrientes *hSlo* es consecuencia de un bloqueo dependiente del potencial, inducido por el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en la solución del baño.

La dependencia de la  $[Ba^{2+}]$  y del potencial del decaimiento de la corriente es consecuente con un esquema de reacción en que un ion  $Ba^{2+}$  interactúa con un sitio ubicado en el campo eléctrico transmembranal. Las bases que sostienen esta afirmación provienen de tres tipos de resultados: i. la dependencia del potencial de la inhibición de la corriente en estado estacionario, sin  $Ba^{2+}$  añadido o con  $Ba^{2+}$  agregado son indistinguibles; ii. la velocidad de recuperación de la corriente en ausencia nominal de  $Ba^{2+}$  es similar a la velocidad de recuperación desde el bloqueo inducido por  $Ba^{2+}$  añadido; iii. la adición del quelante de  $Ba^{2+}$ , A18C6T, remueve prácticamente en forma absoluta la inhibición de la corriente observada sin  $Ba^{2+}$  añadido.

La posibilidad de que los canales  $K_{Ca}$  fueran bloqueados por el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en la solución interna fue propuesta por Neyton y Miller (1988).

Los autores observaron una relación lineal entre la velocidad de bloqueo por bario y la  $[Ba^{2+}]$ , cuyo intercepto en la ordenada ( $[Ba^{2+}]$  añadido = 0) era distinto de cero. Coincidentemente con lo observado en esta tesis, la velocidad de bloqueo sin  $Ba^{2+}$  añadido reportada por los autores fue de  $5\text{ s}^{-1}$ . Más aun, la extrapolación de la recta a la velocidad de bloqueo  $\alpha = 0$ , indica que la  $[Ba^{2+}]$  contaminante era  $\approx 300\text{ nM}$  en los experimentos de Neyton y Miller (1988). Este valor concuerda razonablemente con aquel obtenido en esta tesis<sup>1</sup> ( $\approx 70\text{ nM}$ ; Fig. 18).

La presencia de períodos silentes de larga duración ( $\approx 6\text{ s}$ ) en la actividad de los canales  $K_{Ca}$  únicos fue interpretada como intervalos de tiempo en que el canal está bloqueado o "inactivado" por  $Ca^{2+}$  (Vergara y Latorre, 1983; Findlay y col. 1985). El hecho que un aumento de cuatro veces en la  $[Ca^{2+}]$  no tenga efecto en la constante de tiempo de la relajación de la corriente (Fig. 14C) es un resultado que contradice la interpretación sugerida por Vergara y Latorre (1983). Díaz y col. (1996) mostraron que el A18C6T incrementa la duración de los períodos de actividad sin modificar la duración promedio de los eventos silentes largos observados sin  $Ba^{2+}$  añadido. Si el bloqueo es inducido por  $Ba^{2+}$ , la duración de los períodos de actividad será inversamente proporcional a la  $[Ba^{2+}]$ . Como el éter corona quela específicamente al

---

<sup>1</sup> El origen del  $Ba^{2+}$  contaminante no es claro. Copello y col. (1991) demostraron que una fuente importante de contaminación por  $Ba^{2+}$  es el vidrio usado en la fabricación de las pipetas de registro. Los autores demostraron que las pipetas fabricadas con vidrio de sílice ("soda glass" Blue-tip; Fischer Scientific) liberaban suficiente  $Ba^{2+}$  como para causar un bloqueo de los canales  $K_{Ca}$  en parches escindidos con la cara externa hacia afuera. Como este efecto no se observó con pipetas estiradas de vidrio de borosilicato, como las usadas en esta tesis, y dado que la  $[Ba^{2+}]$  en el agua potable es submicromolar (Neyton, 1996), la fuente de contaminación podría estar en los reactivos usados en la preparación de las soluciones.

$Ba^{2+}$ , el origen más probable de los períodos silentes es el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en la solución interna. Una observación que refuerza esta aseveración es la gran coincidencia de la constante de tiempo de recuperación de las corrientes macroscópicas sin  $Ba^{2+}$  añadido ( $\tau_r = 3,8 \pm 0,9$  s) con la duración promedio de los períodos silentes observados en esa condición ( $3,9 \pm 3$  s; Díaz y col. 1996). Este resultado sugiere fuertemente que la inhibición de las corrientes macroscópicas y los períodos silentes de larga duración observados en la actividad de los canales únicos son consecuencia del mismo fenómeno: un bloqueo dependiente del potencial inducido por el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en la solución interna.

El efecto del éter corona en la cinética de los canales únicos fue estudiado en detalle por Neyton (1996). Neyton (1996) demostró que la dependencia del potencial de la duración de los eventos silentes largos y de los períodos de actividad observados en ausencia nominal de  $Ba^{2+}$  era indistinguible de la observada para los mismos en presencia de  $Ba^{2+}$ . El  $K^+$  externo ejerce dos efectos sobre el bloqueo por  $Ba^{2+}$ . En el intervalo de 0 a 10 mM el  $K^+$  induce una inhibición de la velocidad de disociación del  $Ba^{2+}$  con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de  $\approx 0,2$  mM (Neyton y Miller, 1988). Esto se traduce en un aumento del tiempo de residencia del  $Ba^{2+}$  en el sitio de bloqueo y sería una consecuencia de la ocupación por el  $K^+$  de un sitio en el extremo externo de la vía de conducción (efecto "lock-in", Neyton y Miller, 1988). Adicionalmente, el  $K^+$  externo inhibe la reacción de asociación del  $Ba^{2+}$  interno con una  $K_i \approx 0,5$  mM, efecto que se observa como un aumento de la duración de los períodos de actividad (Neyton y

Miller, 1988). Neyton (1996) demostró que el potencial eléctrico y el  $K^+$  externo tienen los mismos efectos recién descritos sobre los períodos silentes largos y los períodos de actividad observados en ausencia nominal de  $Ba^{2+}$ . Nuevamente, los resultados concuerdan con la hipótesis del bloqueo inducido por el  $Ba^{2+}$  contaminante (Neyton y Miller, 1988). A partir de la dependencia de la  $[Ba^{2+}]$  de la velocidad de bloqueo, Neyton (1996) estimó que la  $[Ba^{2+}]$  contaminante en sus soluciones alcanza a 30 nM. Neyton (1996) evaluó la actividad quelante del A18C6T midiendo el efecto de concentraciones crecientes de la molécula en la cinética de bloqueo por  $Ba^{2+}$  de un canal  $K_{Ca}$  de músculo esquelético de rata. El quelante redujo la frecuencia de los eventos de bloqueo inducidos por el  $Ba^{2+}$  añadido (es decir indujo un incremento de la duración de los períodos activos), sin modificar la duración de los eventos de bloqueo. En concordancia con el resultado observado en el caso del canal *hSlo*, cuyo origen es el músculo liso, el éter corona también fue capaz de reducir la frecuencia de los períodos silentes largos observados en ausencia nominal de  $Ba^{2+}$ . El efecto del quelante fue descrito satisfactoriamente suponiendo una reacción bimolecular de unión entre el  $Ba^{2+}$  y el éter corona. Tomando en cuenta que el quelante también es capaz de unir  $K^+$ , catión mayoritario en el medio, se obtuvo una constante de disociación para el complejo  $Ba^{2+}$ -A18C6T de  $3,5 \cdot 10^{-10}$  M. Este valor concuerda plenamente con la estimación de  $1,6 \cdot 10^{-10}$  M hecha en esta tesis, que a diferencia de la hecha por Neyton (1996) incluyó además una corrección que toma en cuenta el equilibrio de unión del quelante con el  $Ca^{2+}$  presente en el medio.

### 2.1. Características del bloqueo por $Ba^{2+}$ de los canales $hSlo$ .

El bloqueo por  $Ba^{2+}$  de los canales  $hSlo$  muestra la mayoría de las características que presenta el bloqueo por  $Ba^{2+}$  de otros canales  $K_{Ca}$  (Vergara y Latorre, 1983; Hunter y col. 1984; Benham y col. 1984; Gitter y col. 1987; Guggino y col. 1987; Pérez y col. 1994). La constante de disociación del complejo  $Ba^{2+}$ -canal calculada a partir de las constantes de velocidad de disociación ( $\beta = 0,26 \text{ s}^{-1}$ ) y asociación ( $k_1 = 7,08 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) a 0 mV es de  $37 \text{ }\mu\text{M}$ . El bloqueo depende del potencial como si el  $Ba^{2+}$  se uniera a un sitio en que el potencial eléctrico ha caído en un  $80 \pm 7 \%$  ( $\delta = 0,8 \pm 0,07$ ). Sin embargo, la dependencia del voltaje del bloqueo inducido por una partícula cargada no tiene una interpretación única en cuanto a la distancia eléctrica del sitio de unión del bloqueador. Si la vía de conducción del canal tiene ocupación múltiple, como en el caso de los canales  $K_{Ca}$  (Eisenman y col. 1986; Cecchi y col. 1987; Neyton y Miller, 1988; Latorre 1994), la dependencia del potencial observada corresponde a (Armstrong y col. 1982):

$$z\delta = z_1 \cdot \delta_1 + z_{i+1} \cdot \delta_{i+1} + \dots + z_n \cdot \delta_n \quad (42)$$

donde los subíndices ( $i = 1, 2, n$ ) definen a un ion dado,  $z_i$  es la valencia del ion  $i$  y  $\delta_i$  es la distancia eléctrica recorrida por el ion  $i$ . Así entonces un valor de  $z\delta = 1,6$  puede interpretarse como el movimiento de un ion  $Ba^{2+}$  hasta un sitio ubicado en una distancia eléctrica de  $0,4$  ( $z\delta = 0,8$ ) acoplado al movimiento de dos iones  $K^+$  que se mueven una distancia eléctrica de  $0,4$  ( $z\delta = 2 \cdot 0,4$ ).

La dependencia del potencial del bloqueo concuerda con la idea que el sitio de unión del  $Ba^{2+}$  se encuentra en la vía de conducción del poro del canal *hSlo*. La mayor parte de la dependencia del potencial de la reacción de bloqueo se encuentra en la constante de velocidad de la reacción de asociación. Este hecho indica que el perfil de energía que el ion  $Ba^{2+}$  experimenta en su movimiento desde y hacia su sitio es asimétrico, y que el pico de la barrera de energía que el ion  $Ba^{2+}$  debe superar está muy cerca del sitio de unión (Fig. 36). A partir de la constante de disociación del complejo  $Ba^{2+}$ -canal a 0 mV ( $K_D = 37 \mu M$ ) y utilizando la relación:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln (1 / K_D) \quad (43)$$

se obtuvo un  $\Delta G$  de -5,95 Kcal para la unión de  $Ba^{2+}$ . Utilizando la constante de velocidad de disociación ( $\beta = 0,26 \text{ s}^{-1}$ ) y suponiendo una frecuencia vibracional promedio para una reacción de primer orden de  $6,11 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$  ( $\phi$ ), se puede obtener la energía de activación para la salida del  $Ba^{2+}$  desde su sitio ( $\Delta G^*_D$ ), con la relación:

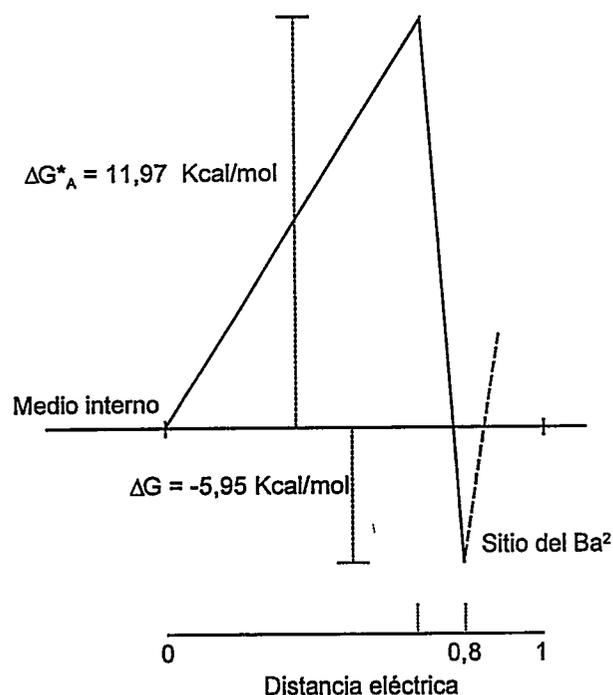
$$\Delta G^*_D = -R \cdot T \cdot \ln (\beta / \phi) \quad (44)$$

El valor obtenido fue de 17,92 Kcal/mol. Con estos valores y usando la relación:

$$\Delta G^*_A = \Delta G^*_D - \Delta G \quad (45)$$

se estimó que la altura de la barrera que el  $Ba^{2+}$  sobrepasa para llegar a su sitio desde el medio interno ( $\Delta G^*_A$ ) es de 11,97 Kcal/mol (Fig. 36).

La estabilidad del complejo formado por el  $Ba^{2+}$  con los canales  $K_{Ca}$  se ha explicado sobre la base de la similitud del radio iónico del  $Ba^{2+}$  ( $r = 1,35 \text{ \AA}$ ) con el del  $K^+$  ( $r = 1,33 \text{ \AA}$ ) (Vergara y Latorre, 1983). Esta consideración junto con la



**Figura 36.** Esquema de la distancia eléctrica y del perfil de energía del sitio de unión de  $Ba^{2+}$ .

El pico de la barrera de energía se encuentra a una distancia eléctrica de 0,66 y el sitio de unión del  $Ba^{2+}$  a una distancia de 0,8. La profundidad del pozo de energía ( $\Delta G$ ) se obtuvo del cálculo de la constante de disociación del complejo  $Ba^{2+}$ -canal a 0 mV ( $K_D$ ). La altura del pico de la barrera de energía que se opone a la llegada del  $Ba^{2+}$  a su sitio desde el medio interno, se estimó a partir de la diferencia entre la energía de activación de la salida del  $Ba^{2+}$  desde su sitio ( $\Delta G^*_D$ ) y  $\Delta G$  (ver el texto).

naturaleza bivalente del bario permitiría que el catión resida en el sitio durante segundos. La constante de velocidad de disociación del  $Ba^{2+}$  desde su sitio en *hSlo* ( $0,26 \text{ s}^{-1}$ ) es aproximadamente  $4 \cdot 10^8$  veces más lenta que constante de velocidad de disociación del  $K^+$  ( $\approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ ; Moczydlowski y col. 1985). Los canales  $K_{Ca}$  sólo permiten la conducción de cationes alcalinos monovalentes de tamaño similar, como el  $K^+$  y el  $Rb^+$ , sugiriendo la existencia de una región estrecha denominada filtro de selectividad (Hille 1975; Latorre y Miller, 1983). Es posible entonces que el  $Ba^{2+}$  se una a esta estructura (Miller y col. 1987).

El grado de identidad de la región que forma el poro (P) de los canales  $K_{Ca}$  con la de *Shaker*, es notablemente alta (Latorre y col. 1994). En el canal *Shaker* estudios de mutagénesis sistemática del poro indicaron que la discriminación de iones se

produce en esta región y que el  $K^+$  interactúa con átomos de oxígeno de los grupos carbonilos del esqueleto peptídico de la proteína (Heginbotham y col. 1994). Adicionalmente, la región P de los canales  $K_{Ca}$  como también la de *Shaker*, posee un residuo aspartato río abajo de la secuencia característica de glicina-tirosina-glicina (GYG). La cadena lateral de este aminoácido cargado negativamente se proyecta en el lumen del poro de los canales *Shaker* (Lü y Miller, 1995). Si el residuo equivalente en el canal de  $K^+$  Kv2.1 (aspartato 378) es neutralizado a treonina, la secuencia de selectividad para los cationes alcalinos no se altera, pero la permeabilidad del  $Na^+$  aumenta cinco veces en relación a la del  $K^+$  (Kirsch y col. 1995). La secuencia GYG es importante en la determinación de la selectividad a cationes del canal de  $K^+$  *Shaker* (Heginbotham y col. 1992 y 1994). Ranganathan y col. (1996) utilizaron un bloqueador peptídico del canal *Shaker*, la agitoxina 2 (AgTX2), cuya estructura tridimensional se conoce, para restringir la ubicación espacial de los residuos que forman el filtro de selectividad del canal. En una primera etapa, se definieron los residuos del canal y de la toxina que son importantes para la interacción en el complejo toxina-canal. Uno de los residuos del canal que determina la unión de la toxina es la tirosina de la secuencia GYG (Y445). Por otro lado, la lisina 27 es uno de los residuos de la AgTX2 que determina su unión al canal. La afinidad de la toxina decrece cuando la  $[K^+]$  externo aumenta, efecto que depende de la presencia de la lisina en la posición 27 de la toxina. Una interpretación posible a este hallazgo es que cuando se forma el complejo toxina-canal, la toxina queda muy cerca de un sitio de unión a  $K^+$  del canal. Dado que la lisina 27 en la AgTX2 y la tirosina 445 del canal interactúan entre sí

(Ranganathan y col. 1996), los resultados indican que la región GYG media la unión de un ion  $K^+$ . Ranganathan y col. (1996) pudieron definir varios pares de residuos del canal y de la toxina que interactúan específicamente. Esta información y la estructura tridimensional de la superficie de interacción de la AgTX2 con el canal, fue consecuente con la localización de la tirosina 445 en el eje central de simetría del canal. Así entonces, Ranganathan y col. (1996) propusieron que la selectividad iónica está determinada en el lugar donde los cuatro lazos GYG del homotetrámero se acercan para formar el filtro de selectividad. Por otro lado, el anillo de grupos carboxilatos de los residuos de aspartato que están río abajo de la secuencia GYG, podrían participar en las interacciones coulombicas que estabilizan el complejo  $Ba^{2+}$ -canal.

### 3. Rasgos estructurales y activación de los canales $K_{Ca}$ .

La similitud de la estructura primaria de los canales  $K_{Ca}$  con la de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial permitió incluir a los primeros en la familia S4 de los canales iónicos dependientes del potencial (Jan y Jan, 1990; Atkinson y col. 1991; Adelman y col. 1992; Wallner y col. 1996). Los canales  $K_{Ca}$  clonados hasta ahora tienen una estructura central de siete segmentos transmembranales (S0 a S6) que es conservada en relación a los canales de la familia S4. Específicamente, la región que forma el poro de los canales  $K_{Ca}$  tiene un alto grado de identidad con la región P de los canales de  $K^+$  y los segmentos S2, S3 y S4 tienen aminoácidos cargados conservados

en relación a los canales de la familia S4 (Wallner y col. 1996). Actualmente existe una plétora de resultados que indican que estos residuos cargados forman parte del sensor de potencial de los canales iónicos dependientes del potencial. Los resultados incluyen estudios de mutagénesis y caracterización de la dependencia del potencial de las corrientes iónicas o de compuerta de los canales de  $K^+$  (Lopez y col. 1991, McCormack y col. 1991; Papazian y col. 1991; Liman y col. 1991; Logothetis y col. 1992; Schoppa y col. 1992; Logothetis y col. 1993; Perozo y col. 1994; Papazian y col. 1995; Planells-Cases y col. 1995; Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y col. 1996; Tiwari-Woodruff y col. 1997) de los canales de  $Na^+$  (Sthümer y col. 1989; Chen y col. 1996; Kontis y col. 1997; Kontis y Goldin, 1997) y de los canales de  $Ca^{2+}$  (García y col. 1996). Adicionalmente, estudios de accesibilidad al sensor de potencial putativo desde el medio interno o externo y la dependencia de ésta del estado de activación de los canales han proporcionado resultados que indican que efectivamente el sensor putativo se mueve en respuesta a cambios del potencial (Yang y Horn, 1995; Larsson y col. 1996; Mannuzzu y col. 1996; Yang y col. 1996; Starace y col. 1997, 1998).

Los canales  $K_{Ca}$  poseen dos regiones que no se encuentran en los canales dependientes del potencial y que están involucradas en el proceso de activación: i. Un segmento transmembranal adicional (S0) previo al segmento S1, que dirige el extremo amino hacia el espacio extracelular (Wallner y col. 1996; Meera y col. 1997). El segmento S0 y parte de la cola amino extracelular le confieren a *hSlo* la capacidad de ser regulado por la subunidad  $\beta$ . Uno de los efectos de ésta es reducir el voltaje

necesario para alcanzar una  $P_o = 0,5$  ( $V_{1/2}$ ) para una  $[Ca^{2+}]$  dada, sin cambiar la dependencia del potencial de la activación (McManus y col. 1995; Meera y col. 1996, Wallner y col. 1996). ii. Una gran cola carboxilo terminal, que constituye cerca de dos tercios del total de los residuos del canal y que contiene 4 segmentos hidrófobos (S7 a S10) probablemente intracelulares (Meera y col. 1997). Wei y col. (1994) demostraron que la región del extremo carboxilo que comprende los segmentos hidrófobos S9 y S10 es imprescindible para que los canales  $K_{Ca}$  se expresen funcionalmente y sugirieron además que este sería el dominio que contiene los sitios de unión de  $Ca^{2+}$ . Schreiber y Salkoff (1997) recientemente reportaron resultados que apoyan esta hipótesis.

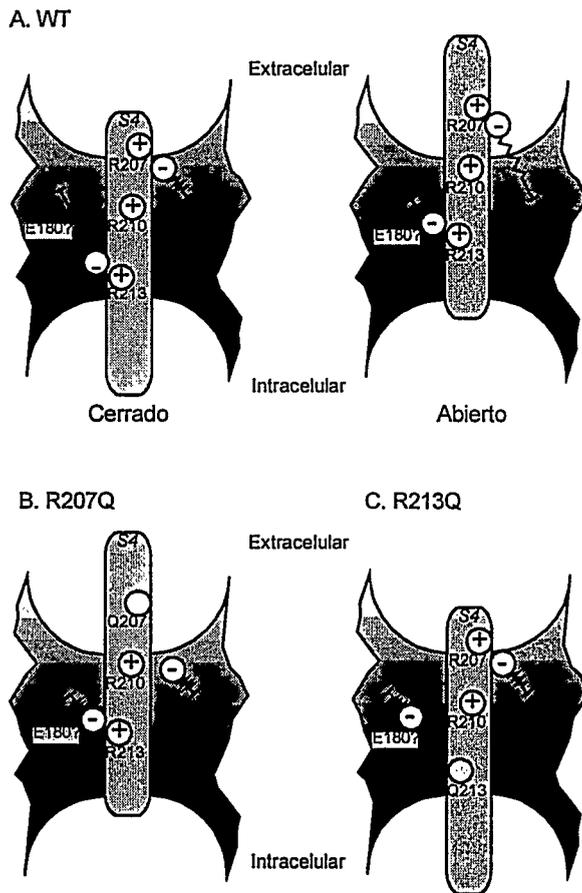
#### 4. Residuos involucrados en la detección del potencial transmembranal en *hSlo*.

Los resultados descritos en esta tesis concuerdan con el modelo en que la dependencia del potencial de la activación del canal es una consecuencia del movimiento del sensor de potencial intrínseco en el campo eléctrico. Específicamente, los resultados demuestran que el segmento S4 del canal  $K_{Ca}$  *hSlo* es una parte importante del sensor de voltaje. El canal *hSlo* posee sólo tres residuos positivos en su segmento S4: las argininas 207, 210 y 213 (Fig. 27, alineamiento 2). La neutralización de las argininas 210 y 213 reduce el número de cargas de compuerta, sugiriendo que estos residuos son los afectados por el potencial eléctrico. La neutralización de la arginina 207 no modifica la dependencia del potencial de la activación y por lo tanto

estaría fuera del campo eléctrico (Tabla 1, tercera columna). Adicionalmente, mutaciones en las tres argininas inducen cambios en la estabilidad del estado cerrado en relación al estado abierto. Estos resultados se esquematizan en el modelo de la figura 37. Es necesario recalcar que no existen datos experimentales que evidencien las interacciones electrostáticas que se plantean, por lo tanto el modelo debe considerarse solamente como una hipótesis de trabajo y no como una conclusión de los resultados. La posición del segmento S4 está determinada por el potencial transmembranal y por la interacción electrostática de las argininas 207 y 213 con residuos negativos. La arginina 213 interactuaría con el glutamato 180 del segmento S3, favoreciendo la conformación abierta del canal. Las bases para plantear esta interacción se discuten en la sección 6 de este capítulo. Cuando la arginina 207 es neutralizada (R207Q) se estabiliza la conformación abierta del canal en relación al silvestre (WT). Para explicar este efecto se especula que existiría una interacción de la arginina 207 con un residuo negativo desconocido, que tendería a favorecer el estado cerrado (Fig. 37A). La estabilización se debería a que en ausencia de la interacción electrostática del residuo 207 (glutamina) con el residuo negativo vecino predominaría el efecto estabilizador del estado abierto de la interacción de la arginina 213 con el glutamato 180 (Fig. 37B).

Cuando la arginina 213 es mutada por un aminoácido neutro (R213Q), se produce una disminución de la dependencia del potencial de la activación (Tabla 1) y la estabilización de la conformación cerrada del canal (Tabla 2). Este último efecto se debería a la pérdida de la interacción electrostática del residuo 213 con el glutamato

180 en el mutante. Esto tiene como consecuencia el predominio de la interacción de la arginina 207 con su contra carga, que favorece el estado cerrado.



**Figura 37.** El segmento S4 como parte del sensor de potencial: un modelo altamente especulativo.

El diagrama muestra la configuración del sensor para el canal silvestre (WT) y para los mutantes R207Q y R213Q. La carga positiva de las argininas 207, 210 y 213 del segmento S4 (S4) se representa con cruces (+). Las regiones vecinas al segmento S4 en que cae el potencial eléctrico transmembranal, se indican con un degradé. Solamente las argininas 210 y 213 se ubican en esta zona. A. Cuando la membrana está hiperpolarizada (interior negativo), el sensor de potencial se encuentra desplazado hacia el lado intracelular y el canal está en el estado cerrado (izquierda). La interacción de la arginina 207 (R207) con un residuo negativo (desconocido) estabilizaría el estado cerrado. La interacción de la arginina 213 (R213) con un residuo negativo, posiblemente el glutamato 180 del segmento S3, estabilizaría el estado abierto.

Cuando la membrana se despolariza el sensor se desplaza hacia el lado extracelular y el canal se abre. B. Si la arginina 207 se muta por el residuo neutro glutamina (Q207) se pierde la interacción electrostática con el residuo negativo vecino, estabilizándose así la conformación abierta del canal, en relación al WT. C. Al neutralizar la arginina 213 (Q213) la interacción electrostática con E180 se pierde favoreciéndose la interacción de R207 con su contracarga. Esto tiene como resultado la estabilización de la conformación cerrada del canal.

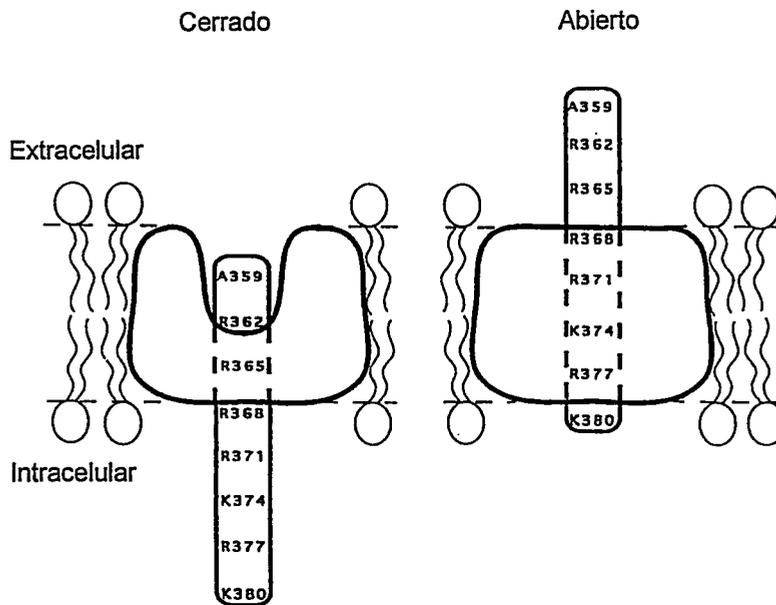
La neutralización de la arginina 210 produce una estabilización marcada del estado cerrado cuando el residuo introducido es una glutamina (R210Q). Sin embargo,

si el residuo es reemplazado por una asparragina (R210N) no se producen mayores cambios en las estabilidades relativas de los estados cerrado y abierto. No se puede afirmar entonces que los efectos obtenidos con estas neutralizaciones se deban a la pérdida de una interacción electrostática de la arginina 210 con un aminoácido cargado negativamente.

En el canal  $K_v$  *Shaker*, los residuos equivalentes a las argininas de *hSlo* son las argininas 365, 368 y 371 (Fig. 27, alineamiento 2). En este canal se demostró que la accesibilidad a los residuos del segmento S4 dependen del estado de activación del canal (Mannuzzu y col. 1996; Larsson y col. 1996). Larsson y col. (1996) mutaron residuos del segmento S4 y de sus cercanías por cisteínas y sondearon su accesibilidad desde el medio externo o interno con reactivos tiol no permeantes. Los resultados obtenidos indicaron que sólo la arginina 365 es inaccesible en el estado cerrado, situando uno de los residuos cargados (R362) en el medio extracelular y los cinco restantes en el medio interno. Cuando el canal *Shaker* se activa, esta distribución se altera totalmente, pues la arginina 365 se hace ahora accesible al medio externo y cuatro de los cinco residuos cargados que estaban expuestos al medio intracelular quedan inaccesibles (R368, R371, K374 y R377; Fig. 38). A partir de estos resultados, Larsson y col. (1996) propusieron que los cinco residuos positivos incluidos entre las argininas 365 y 377 contribuyen a la carga de compuerta total por canal.

Sin embargo, si la carga de compuerta por canal para canales *Shaker* silvestres y mutantes del segmentos S4 se determina midiendo la carga a partir de las corrientes de compuerta y el número de canales presentes en la membrana a partir del ruido no

estacionario de la corriente iónica (Seoh y col. 1996), se obtiene un resultado distinto. Este metodología indica que solo tres de los aminoácidos básicos, las argininas 365, 368 y 371, contribuyen con su carga a la carga de compuerta. Por otro lado, Aggarwal y MacKinnon (1996) determinaron el número de canales presentes con un ensayo de unión de una toxina específica para el canal *Shaker*, agitoxina, y la carga de compuerta como se midió el caso anterior. Ellos encontraron que además de los tres residuos ya mencionados, la arginina 362 también aportaría a la carga de compuerta.



**Figura 38.** Movimiento del segmento S4 durante la activación del canal *Shaker*.

El dibujo esquematiza el segmento S4 y la región de la proteína que rodea al segmento en una subunidad, en la conformación cerrada y abierta. En el estado cerrado cinco residuos (363-367) cubren la distancia entre el medio extracelular e intracelular, dejando sólo un residuo básico (R365) inaccesible al reactivo tiol. Esta distancia corresponde a 8 Å si los residuos formaran una  $\alpha$ -hélice, o a 18 Å si estuvieran en conformación hoja  $\beta$ . Una hendidura en la proteína permitiría el acceso a los residuos A359 y R362 desde el medio externo. Cuando ocurre el cambio a la conformación abierta, el segmento S4 se mueve hacia afuera y la hendidura desaparece, dejando de 9 a 12 residuos inaccessibles. (Figura modificada de Larsson y col. 1996)

A la luz de estos resultados, es sorprendente que aunque *hSlo* posee tres de los residuos básicos equivalentes a los cuatro residuos que en *Shaker* se ha determinado que son responsables de la dependencia del potencial, su dependencia de potencial sea tanto más baja: 4,4 cargas en *hSlo* (Stefani y col. 1997) y 13 cargas en *Shaker*. Una explicación posible para este hecho es que uno de estos tres residuos, la arginina 207 no contribuye a la carga de compuerta por canal. En cambio el residuo equivalente de *Shaker* (R365) contribuye con 5 cargas electrónicas (Seoh y col. 1996). Más aún, el residuo E293 del segmento S2 de *Shaker* es parte del sensor de potencial (Papazian y col. 1995; ver Planell-Casels y col. 1995) contribuyendo a él con 6 cargas electrónicas (Seoh y col. 1996). Este residuo es uno de los residuos acídicos conservados de los segmentos S2 y S3 de los canales  $K_v$  (Wallner y col. 1996). En la posición equivalente de los canales  $K_{Ca}$  el residuo corresponde a una tirosina (Y163). La carencia de este aminoácido negativo podría contribuir a la menor dependencia del potencial de *hSlo*.

Los resultados obtenidos con las neutralizaciones de los residuos E293 y R365 de *Shaker* son inesperados y ponen una luz de alerta en la interpretación de los resultados de mutagénesis. Como los canales de  $K^+$  son homotetrámeros, la neutralización de un residuo cargado del sensor debiera reducir en cuatro el número de cargas de compuerta, si dicho residuo se mueve en la totalidad del campo eléctrico durante la activación del canal. Si la neutralización de un residuo produce una disminución mayor que ésta, el resultado implica que el residuo además de participar con su carga en el sensor, determina la forma del dieléctrico donde el resto de las cargas se mueven. Así entonces, estrictamente no se puede descartar que una parte de

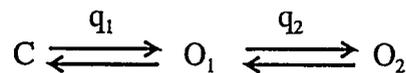
los efectos obtenidos con la neutralización de las argininas 207, 210 y 213 de *hSlo* tenga su origen en la modificación del dieléctrico.

##### 5. Limitaciones de las medidas de $z_{eq}$ .

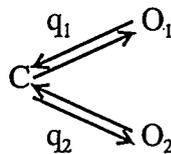
El método de la pendiente límite (MPL) confirmó que sólo las argininas 210 y 213 son capaces de modificar el número de cargas de compuerta acopladas energéticamente a la apertura del poro de *hSlo*. Un método independiente para medir el número total de cargas de compuerta por canal es evaluar la razón entre el movimiento de carga total (Q) y el número de canales activos (N) en el mismo área de membrana (Schoppa y col. 1992; Nocetti y col. 1996; Seoh y col. 1996). Este método (Q/N) fue aplicado sólo recientemente al canal *hSlo* (Stefani y col. 1997), encontrándose 4,4 cargas equivalentes por canal. Este resultado indica que el valor de  $z_{eq}$  obtenido ajustando la distribución de Boltzmann a los datos o con el MPL subestiman la carga de compuerta total de *hSlo* en aproximadamente 2,9 cargas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que como el método Q/N evalúa la carga total a partir de las corrientes de compuerta, puede incluir en esta determinación movimientos de carga que no están acoplados a la apertura del canal (Nocetti y col. 1996).

Almers (1978) demostró que para una vía de activación que sigue una secuencia lineal de estados cerrados que terminan en un solo estado abierto, si la activación tiende a cero, la pendiente de la curva de activación graficada en una ordenada logarítmica alcanza un máximo ("pendiente límite"), el cual es independiente del

número de estados. Este método permite una buena estimación de la carga de compuerta, pero en ciertas condiciones puede llevar a estimaciones erróneas. Schoppa y col. (1992) reportaron que mutaciones que no modifican el número de residuos cargados del sensor de potencial putativo pueden cambiar el equilibrio de las transiciones dependientes del potencial de manera tal que la pendiente límite sólo puede ser alcanzada a valores de  $P_o$  extremadamente bajos. En este caso el MPL subestima el número total de cargas de compuerta pues la pendiente límite se alcanza a valores de  $P_o$  demasiado bajos para ser medidos. Noceti y col. (1996) y Sigg y Bezanilla (1997) revisaron la aplicación del MPL a modelos de activación más complejos que la vía secuencial con un estado abierto final. Si el modelo es lineal con dos estados abiertos ( $O_1$  y  $O_2$ ) luego del estado cerrado (C):



el MPL pierde su validez pues no considera la carga movida en la transición entre los estados abiertos ( $q_2$ ) (Noceti y col. 1996; Sigg y Bezanilla, 1997). Si el modelo posee estados abiertos que se ramifican desde un estado cerrado:



la transición con la barrera de energía más baja a potenciales negativos predominará y el valor de  $z_{eq}$  obtenido corresponderá al de la carga transportada en esa rama.

En el caso de los canales  $K_{Ca}$ , se requieren al menos tres estados abiertos para ajustar los datos de canal único (McManus y Magleby, 1991; Silberberg y col. 1996).

Por lo tanto, se espera que el MPL de un valor inferior de  $z_{eq}$  que el obtenido de las medidas de corriente de compuerta y del número canales presentes.

6. *Las mutaciones que suprimen la expresión de las corrientes hSlo plantean interacciones posibles entre los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4.*

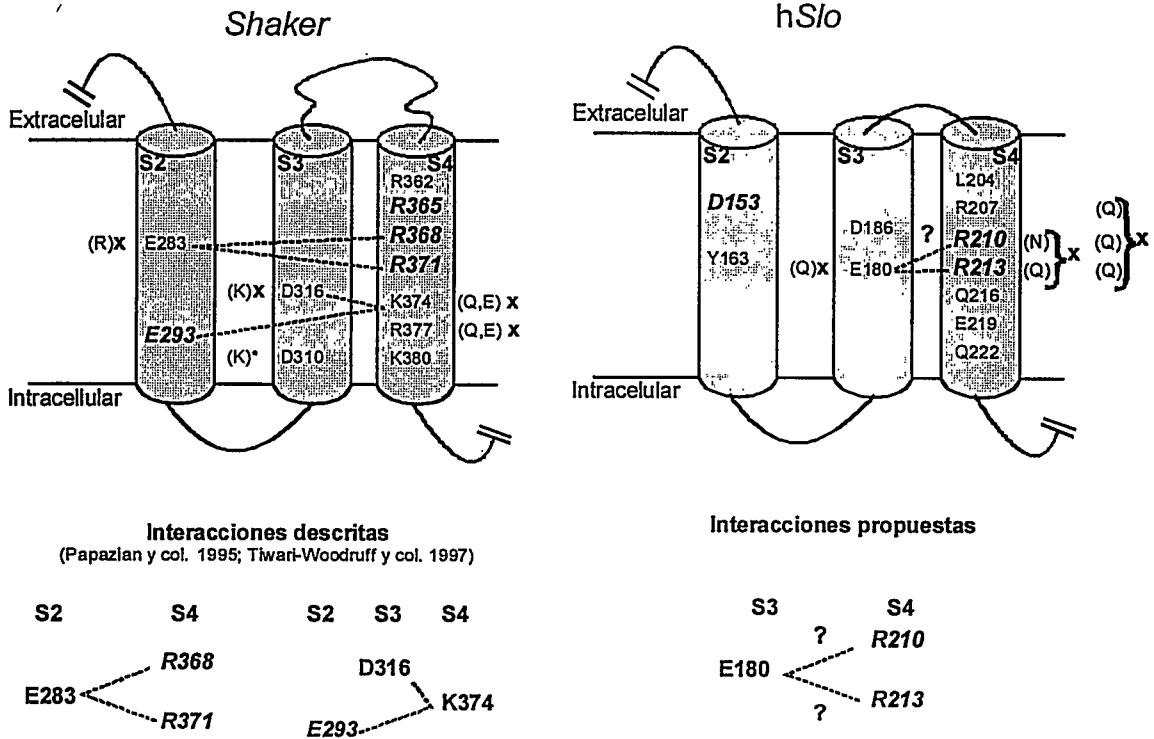
Desde el punto de vista estructural, los resultados obtenidos con las mutaciones del segmento S4, sugieren que la estructura del sensor de voltaje del canal  $K_{Ca}$  hSlo es distinta de la del sensor del canal  $K_v$  Shaker. Todas las mutaciones simples de este segmento originaron canales funcionales, es decir, canales capaces de conducir corriente iónica. Las mutaciones incluyeron a aquellas en que los residuos básicos conservados fueron neutralizados o revertidos en su carga como también aquellas en que los residuos ácidos, polares o hidrófobos, pero que en el canal Shaker son básicos, se neutralizaron o mutaron por residuos cargados positivamente. Sólo una neutralización simple en el segmento S3, (ácido glutámico 180 a glutamina) fue capaz de suprimir la expresión funcional (comunicación personal, Tesis para optar al grado de Bioquímica, Julio Amigo) (Fig. 39). Estos resultados difieren notablemente de los reportados para el canal Shaker. En este canal la neutralización o reversión de carga de los residuos K374 y R377 en el segmento S4 eliminan la expresión (Papazian y col. 1991; Papazian y col. 1995; Tiwari-Woodruff y col. 1997). Adicionalmente la reversión de la carga del residuo ácido E283 del segmento S2 reduce en un 50% la cantidad de la forma madura de la proteína Shaker. La reversión de la carga de los

residuos D310 y D316 del segmento S3 produce una disminución de un 60% o 100% de la forma madura de *Shaker*, respectivamente.

La supresión de la expresión inducida por estas mutaciones se ha explicado proponiendo que los residuos cargados interactúan electrostáticamente con residuos de carga opuesta, para formar pares iónicos o redes de cargas interactuantes que se estabilizan entre sí en el ambiente hidrófobo interno de la proteína. Al neutralizar un residuo se elimina una de las cargas del par iónico o de la red de cargas, generándose un exceso de carga no apareada. Dado que energéticamente es desfavorable mantener una carga en un medio hidrófobo, la estructura de la proteína se haría inestable, perdiendo su configuración funcional (Papazian y col. 1995). Los experimentos de supresión intragénica han permitido establecer cuáles son las interacciones entre los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4. La metodología se basa en la capacidad de una mutación secundaria de suprimir un defecto inducido por una mutación primaria, en la función bajo estudio. Esta metodología se usa normalmente para establecer interacciones electrostáticas entre aminoácidos con carga opuesta en una proteína (Papazian y col. 1995). En el caso de *Shaker*, la mutación primaria, por ejemplo K374E, tiene como resultado una pérdida de la expresión funcional del canal, pérdida que es suprimida por una mutación secundaria (E293), que restaura la función. Es así que en el caso de *Shaker* se estableció que el ácido glutámico 283 del segmento S2 forma una red de cargas que se estabilizan entre si con las argininas 368 y 371 del segmento S4, y que la lisina 374 del segmento S4 interactúa con el glutámico 293 del segmento S2 y con el aspártico 316 del segmento S3 (Fig. 39).

La neutralización del glutamato 180 en el segmento S3 de *hSlo* (E180Q) suprime la expresión (Fig. 39). En *Shaker* el residuo equivalente es el aspartato 310. A diferencia de *hSlo*, la neutralización de este residuo (D310N) produce canales funcionales; adicionalmente la mutación de inversión de la carga (D310K) suprime las corrientes iónicas y reduce la cantidad de proteína madura en un 60%. Por otro lado, la neutralización de la arginina 210 (R210Q o R210N) o de la arginina 213 (R213Q) produce canales funcionales. Sin embargo, la mutación doble en que las argininas 210 y 213 del segmento S4 se neutralizan simultáneamente suprime la expresión. Estos resultados son consecuentes con una interacción del residuo negativo E180 en el segmento S3 con los residuos cargados positivamente R210 y R213 del segmento S4 (Fig. 39). Cuando una de las argininas es neutralizada el glutamato 180 aun podría ser estabilizado por la arginina restante. Sin embargo, al neutralizar el glutamato 180 las dos argininas del segmento S4 quedan sin su contracarga, lo que tendría como resultado una desestabilización de la estructura asociada a la pérdida de función.

La pérdida de la expresión inducida por la mutación de neutralización o inversión de la carga de la lisina 374 de *Shaker* (glutamina 216 en *hSlo*), puede ser contrarrestada por mutaciones supresoras del aspartato 316 en el segmento S3 o del glutamato 293 del segmento S2. En *hSlo* este último residuo corresponde a una tirosina (Y163). Se podría sugerir entonces que *hSlo*, a pesar de tener una glutamina en posición 216, es funcional porque en la posición 163 se encuentra un residuo no cargado. Todos estos resultados indican diferencias entre los segmentos S2, S3 y S4 de



**Figura 39.** Interacciones electrostáticas putativas de los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 de *hSlo*.

En la parte superior se esquematizan los segmentos hidrófobos S2, S3 y S4 del canal  $K_V$  *Shaker* y del canal  $K_{Ca}$  *hSlo*. En cada caso, los residuos que forman parte del sensor de potencial se resaltan en letra itálica grande. Las mutaciones que suprimen la expresión de corrientes están marcadas con una X indicándose entre paréntesis los aminoácidos introducidos. En *hSlo* sólo una mutación simple en el segmento S3 (E180Q) suprime la expresión. En el segmento S4, las mutaciones en que las argininas 210 y 213 se neutralizaron simultáneamente suprimieron la expresión. Estas corresponden a la mutación doble R210N-R213Q y a la mutación triple R207Q-R210Q-R213Q, y se indican con un paréntesis de llave. Las líneas punteadas indican las interacciones descritas en el canal *Shaker* y las interacciones propuestas para *hSlo*.

*hSlo* y *Shaker* y sugieren que la estructura del sensor de potencial en estos canales es diferente. Un resultado que recalca esta sugerencia es el encontrado con un grupo de mutantes de *Shaker* en que se neutralizaron dos, tres o cuatro de los residuos que forman parte del sensor de potencial (E293, R365, R368, R371), en forma simultánea.

Sorprendentemente, todos los mutantes son funcionales (E293Q-R368N, R368N-R371Q, E293Q-R368N-R371Q, R365N-R368N-R371Q y E293Q-R365N-R368N-R371Q), incluso aquellos análogos a los mutantes no funcionales de *hSlo* R210N-R213Q y R207Q-R210Q-R213Q (R368N-R371Q y R365N-R368N-R371Q en *Shaker*) (Seoh y col. 1997).

## CONCLUSIONES

1. Los canales *hSlo* fueron expresados exitosamente en oocitos de *Xenopus laevis*. En este sistema heterólogo las corrientes macroscópicas poseen características que concuerdan plenamente con los rasgos de los canales  $K_{Ca}$  observados en los tejidos nativos.
2. Los canales *hSlo* son bloqueados por el  $Ba^{2+}$  contaminante presente en el medio interno. Este bloqueo se manifiesta en forma de una inhibición dependiente del tiempo y del voltaje de las corrientes macroscópicas. La concentración de  $Ba^{2+}$  contaminante alcanza a  $\approx 70$  nM. Esta inhibición desaparece al agregar al medio interno un éter corona que une  $Ba^{2+}$  con una constante de disociación de  $\approx 10^{-10}$  M. De estos resultados se deduce que los canales *hSlo* expresados en oocitos no poseen un proceso de inactivación dependiente del potencial.
3. Los canales *hSlo* silvestres son dependientes del potencial. La dependencia del potencial concuerda con el movimiento de 1,5 cargas equivalentes de compuerta en el campo eléctrico.
4. La activación de los canales *hSlo* puede ser dependiente o independiente de la  $[Ca^{2+}]$  del medio interno. Si la  $[Ca^{2+}]$  es menor que  $\approx 100$  nM, los canales se activan en

forma puramente dependiente del potencial. Para  $[Ca^{2+}]$  mayores que  $\approx 100$  nM, el  $Ca^{2+}$  facilita la activación, de manera que el potencial en que se alcanza el 50% de la conductancia máxima disminuye a medida que la  $[Ca^{2+}]$  se incrementa.

5. El resultado descrito en el párrafo 5 permite descartar directamente el modelo de activación iónica. Los resultados indican que los canales *hSlo* poseen un sensor de potencial intrínseco.
  
6. El sensor de potencial de *hSlo* está formado en parte por el segmento transmembranal S4. Los residuos involucrados en él son las argininas 210 y 213.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P.R., Constanti A., Brown D.A., and Clark R.B. 1982. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activates a fast voltage-sensitive  $\text{K}^+$  current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature (Lond)*. **296**: 746-749
- Adelman, J.P., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y-N., Lagrutta A., Bond, C.T. and North, R.A. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**: 209-16.
- Aggarwal, S.K., and MacKinnon, R. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker*  $\text{K}^+$  channel. *Neuron* **16**: 1169-1177.
- Almers, W. 1978. Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **82**: 96-190.
- Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., and Gaber, R.F. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3736-3740.
- Anwer, K., Oberti, C., Pérez, G.J., Pérez-Reyes, N., McDougall, J.K., Monga, M., Samborn, B.M. Stefani, E., and Toro, L. 1993. Calcium-activated  $\text{K}^+$  channels as modulators of human myometrial contractile activity.
- Armstrong, C. M. and Bezanilla, F. 1973. Currents related to movement of gating particles of sodium channels. *Nature (Lond)* **242**:459-461.
- Armstrong, C.M., Swenson, R.P. and Taylor, S.R. 1982. Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen Physiol.* **80**: 663-682.
- Armstrong, C.M., and Taylor, S.R. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* **30**: 473-488.
- Atkinson, N.S., Robertson, G.A., and Ganetzky, B. 1991. A component of calcium-activated potassium channel encoded by the *Drosophila slow* locus. *Science* **253**: 551-5.
- Benham, C.D., Bolton, T.B., Lang, K.J., and Takewaki, T. 1985. The mechanism of action of  $\text{Ba}^{2+}$  and TEA on single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in arterial and intestinal

smooth muscle cell membrane. *Pflüegers Archives*. **403**: 120-127.

Blatz, A.L., and Magleby, K.L. **1987**. Calcium-activated potassium channels. *Trends in Neurosci*. **10**: 463-467.

Brayden, J.E. and Nelson, M.T. **1992**. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*. **256**: 532-5.

Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A. and Salkoff, L. **1993**. *mSlo*, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**: 221-4.

Candia, S., García, M.L. and Latorre, R. **1992**. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Biophys. J.* **63**: 583-590.

Catterall, W.A. **1986**. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 953-985.

Cecchi, X., Wolff, D., Alvarez, O., and Latorre, R. **1987**. Mechanisms of  $\text{Cs}^+$  blockade in a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel from smooth muscle. *Biophys. J.* **52**: 707-716.

Chen, L.-Q., Santarelli, V., Horn, R., and Kallen, R.G. **1996**. A Unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels

Copello, J., Simon, B., Segal, Y., Wehner, F., Sadagopa, V.M., Alcock, N., and Reuss, L. **1991**.  $\text{Ba}^{2+}$  release from soda glass modifies single maxi  $\text{K}^+$  channel activity in patch clamp experiments. *Biophys. J.* **60**: 931-941.

Cornejo, M., Guggino, S.E., and Guggino, W.B. **1987**. Modification of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in cultured medullary thick ascending limb cells by N-bromoacetamide. *J. Membr. Biol.* **99**: 147-155.

Cox, D.H., Cui, J., and Aldrich, R. W. **1997a**. Separation of gating properties from permeation and block in *mslo* large conductance Ca-activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Gen. Physiol.* **109**: 633-646.

Cox, D.H., Cui, J., and Aldrich, R. W. **1997b**. Allosteric gating of a large conductance Ca-activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Gen. Physiol.* **110**: 257-281.

Crest, M. and Gola, M. **1993**. Large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels are involved in both spike shaping and firing regulation in *Helix* neurones. *J. Physiol. (Lond)*. **465**: 265-87.

- Cui, J., Cox, D.H., and Aldrich, R.W. 1997. Intrinsic voltage dependence and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of *mslo* large conductance  $\text{Ca}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Gen. Physiol.* 109: 647-673.
- Dhallan, R.S., Macke, J.P., Eddy, R.L., Shows, T.B., Reed, R.R., Yau, K-W., and Nathans, J. 1992. Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J. Neurosci.* 12: 3248-3256.
- Díaz, F., Wallner, M., Stefani, E., Toro, L. and Latorre, R. 1995. Interaction of internal  $\text{Ba}^{2+}$  with a cloned  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel (*hSlo*) from smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 107: 399-407.
- Dietrich, B. 1985. Coordination chemistry of alkali and alkaline-earth cations with macrocyclic ligands. *J. Chem. Education.* 62: 954-964.
- Dworetzky, S.I., Trojnacki, J.T., and Gribkoff, V.K. 1994. Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27: 189-193.
- Eaton, D.C., and Brodwick, M.S. 1980. Effect of barium on the potassium conductance of squid axons. *J. Gen. Physiol.* 75: 727-750.
- Eisenman, G., Latorre, R., and Miller, C. 1986. Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance  $\text{Ca}^{++}$ -activated  $\text{K}^+$  channel from skeletal muscle. *Biophys. J.* 50:1025-1034.
- Elkins, T., Ganetzky, B., Wu, C-F. 1986. A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8415-8419.
- Fay, F.S. 1995. Calcium sparks in vascular smooth muscle: Relaxation regulators. *Science.* 270: 588-589.
- Findlay, I., Dunne, M.J., and Petersen, O.H. 1985. ATP-sensitive inward rectifier and voltage- and calcium-activated  $\text{K}^+$  channels in cultured pancreatic islet cells. *J. Membr. Biol.* 88:165-172.
- Finn, J.T., Grunwald, M.E., and Yau, K-W. 1996. Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 395-426.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. 1990. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* 265: 11083-11090.

- García, J., Nakai, J., Imoto, K., and Beam, K.G. 1996. Role of S4 segments and the leucine heptad motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophys. J.* **72**: 2515-2523.
- García-Calvo M., Knaus, H-G., McManus, O.B., Giangiacomo, K.M., Kaczorowski, G.J. and García, M.L. 1994. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **269**: 676-682.
- Gardos, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **30**: 653-654.
- Gitter, A.H., Beyenbach, K.W., Chadwick, C.W., Gross, P., Minuth, W., and Fromter, E. 1987. High conductance K<sup>+</sup> channels in apical membranes of principal cells cultured from rabbit renal cortical collecting duct anlagen. *Pflüegers Arch.* **408**: 282-290.
- Giangiacomo, K.M., García, M.L. and McManus, O.B. 1992. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **31**: 6719-6727.
- Gola, M., Ducreux, C. and Chagneux, H. 1990. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current involvement in neuronal function revealed by *in situ* single channel analysis in *Helix* neurones. *J. Physiol. (Lond)*. **420**: 73-109.
- Gorman, A.L.F., and Thomas M.V. 1980. Potassium conductance and internal calcium accumulation in a molluscan neurone. *J. Physiol. (Lond)*. **308**: 287-313.
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A., and Chess, A. 1992. Molecular cloning and single channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**: 45-48.
- Guggino, S.E., Guggino, W.B., Gree, N., and Sacktor, B. 1987. Blocking agents of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured medullary thick ascending limb cells. *American Journal of Physiology*. **252**:C128-C137.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflüegers Archiv.* **391**: 85-100.
- Hanke, W., Cook, N.J., and Kaupp, U.B. 1988. cGMP-dependent channel protein from photoreceptor membranes: single channel activity of the purified and reconstituted protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 94-98.

- Heginbotham, L., Abramson, T., and MacKinnon, R. 1992. A functional connection between pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science* **258**: 1152-1155.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. 1994. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal*. **66**: 1061-1067.
- Heginbotham, L. and MacKinnon, R. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron*. **8**: 483-491.
- Hilgemann, D.W. 1989. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch*. **415**: 247-249.
- Hille, B. 1975. Ionic selectivity of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in nerve membranes. "Membranes: a series of advances". G. Eisenman, ed. Marcel Dekker, New York. 3:255-323.
- Hille, B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. Edited by B. Hille. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. Second edition.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. of Physiol. (Lond.)* **117**: 500-544.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. **77**: 61-68.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. 1991. Two types of inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**: 547-556.
- Hunter, M., Lopes, A.G., Boulpape, E., and Giebish, G.H. 1984. Single channel recording of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the apical membrane of cortical collecting tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **81**: 4237-4239.
- Ikemoto, Y., Ono, K., Yoshida, A. and Akaike, N. 1989. Delayed activation of a large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K channels in hippocampal neurons of the rat. *Biophys. J.* **56**: 207-12.

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. 1990. A superfamily of ion channels. *Nature* **345**: 672.

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. 1992. Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel function. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 537-555.

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. 1994. Potassium channels and their evolving gates. *Nature* **371**: 119-122.

Kaupp, U.B. 1991. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci* **14**: 150-157.

Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T., and Numa, S. 1989. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**: 762-766.

Khöler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P. 1996. Small conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**: 1709-1714.

Kirsch, G.E., Pascual, J. M., and Shieh, C-C. 1995. Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-dependent potassium channels. *Biophysical Journal.* **68**: 1804-1813.

Knaus, H-G., García-Calvo M., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L. 1994. Subunit composition of the high conductance, calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the *mSlo* and *slowpoke* family of potassium channels. *J. Biol. Chem.* **269**: 3921-3924.

Komatsu, A., Singh, S., Rathe, P., and Wu, C.-F. 1990. Mutational and gene dosage analysis of calcium-activated potassium channels in *Drosophila*: correlation of micro- and macroscopic currents. *Neuron* **4**: 313-321.

Kontis, K.J., and Goldin, A.L. 1997. Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *J. Gen. Physiol.* **110**: 403-413.

Kontis, K.J., Rounaghi, A., and Goldin, A.L. 1997. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* **110**: 391-401.

Koschak, A., Koch, R. O., Liu, J., Kaczorowski, G. J., Reinhart, P. H., Garcia, M. L., Knaus, H. G. 1997. [<sup>125</sup>I]iberiotoxin-D19Y/Y36F, the first selective, high specific activity radioligand for high-conductance calcium-activated potassium channels.

*Biochemistry* **36**: 1943-1952.

Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* **15**: 8125-8148.

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

Larsson, H.P., Baker, O.S., Dhillon, D.S., and Isacoff, E.Y. 1996. Transmembrane movement of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron* **16**: 387-397.

Latorre, R. 1994. Molecular workings of large conductance (maxi) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. "Handbook of membrane channels: molecular and cellular physiology." Capítulo 5. C. Peracchia, ed. Acad. Press. NY. 79-102.

Latorre, R y Alvarez, O. 1996. Vías y modelos de transporte a través de membranas. *En* R. Latorre, J. López-Barneo, F. Bezanilla, y R. Llinás (eds.), *Biofísica y Fisiología Celular*. Pp 69-118. Universidad de Sevilla.

Latorre, R., Hurst, R., Díaz, F., Toro, L., and Stefani, E. 1997. Barium as a probe of the molecular architecture of the pore of K<sup>+</sup> channels. *En* R. Latorre y J.C. Saez (eds.), *From Ion Channels to Cell-to-Cell Conversations*. Pp 129-146. Plenum Press, New York.

Latorre, R., and Miller, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. *Journal of Membrane Biology*. **71**:11-30.

Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P. and Alvarez, O. 1989. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 385-399.

Latorre, R., Vergara, C. and Hidalgo, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from tranverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**: 805-809.

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

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

Liman, E.R., Tytgat, J., and Hess, P. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**: 861-871.

- Logothetis, D.E., Kammen, B.F., Lindpaintner, K., Bisbas, D., and Nadal-Ginard, B. 1993. Gating charge differences between two voltage-gated K<sup>+</sup> channels are due to the specific charge content of their respective S4 regions. *Neuron* 10: 1121-1129.
- Logothetis, D.E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K., and Nadal-Ginard, B. 1992. Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel result in corresponding decreases in gating charge. *Neuron* 3:531-540.
- Lopez, G.A., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. 1991. Hydrophobic substitution mutations in the S4 sequence alter voltage-dependent gating in *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 7: 327-336.
- Lu, Q., and Miller, C. 1995. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science* 268: 304-307.
- Ludwig, J. Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D., and Kaupp U.B. 1990. Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 270: 24-29.
- Lux, H.D., Neher, E. and Marty, A. 1981. Single channel activity associated with the calcium dependent outward current in *Helix pomatia*. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* 389: 293-295.
- MacKinnon, R. 1995. Pore loops: an emerging theme in ion channels structure. *Neuron.* 14: 889-892.
- MacKinnon, R. 1991. Determination of subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235.
- Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M., and Isacoff, E.Y. 1996. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271: 213-216.
- Markwardt, F. and Isenberg, G. 1992. Gating of maxi K<sup>+</sup> channels studied by Ca<sup>2+</sup> concentration jumps in excised inside-out multi channel patches (myocytes from Guinea pig urinary bladder). *J. Gen. Physiol.* 99: 841-62.
- Marti, A. 1981. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature (Lond).* 291: 497-500.
- McCobb, D.P., Fowler, N.L., Featherstone, T., Lingle, C.J., Saito, M., Krause, J.E., and Salkoff, L. 1995. A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 269: H767-H777.

McCormack, K., Tanouye, M.A., Iverson, L.E., Lin, J-W., Ramaswani, M., McCormack, T., Campanelli, J.T., Mathew, M.K., and Rudy, B. 1991. A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 2931-2935.

McManus O.B. 1991. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**: 537-60.

McManus O.B., Helms L.M.H., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., and Leonard, R.J. 1995. Functional role of the  $\beta$  subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**: 645-650.

McManus, O.B., and Magleby, K.L. 1985. Inverse relationship of the durations of adjacent open and shut interval for Cl and K channels. *Nature* **317**: 625-627.

McManus, O.B., and Magleby, K.L. 1991. Accounting for the Ca<sup>2+</sup>-dependent kinetics of single large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* **443**: 739-777.

Meech, R.W. 1972. Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **42A**: 493-499.

Meech, R.W. 1974. The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. *J. Physiol (Lond)*. **237**: 259-277.

Meech, R.W. 1978. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**: 1-18.

Meech, R.W., and Strumwasser, F. 1970. Intracellular calcium injection activates potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Fed. Proc.* **29**: 834A.

Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z., and Toro, L. 1996. A calcium switch for the functional coupling between  $\alpha$  (*hsl* $\alpha$ ) and  $\beta$  subunits (K<sub>v,ca</sub> $\beta$ ) of maxi K channels. *FEBS Lett.* **382**: 84-88.

Meera, P., Wallner, M., Song, M., and Toro, L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N-terminus and an intracellular (S9-S10) C-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **94**: 14066-14071.

Miledi, R. 1982. A calcium-dependent outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **215**: 491-497.

- Miller, C., Latorre, R. and Reisin, I. 1987. Coupling of voltage-dependent gating and  $Ba^{2+}$  block in the high conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel. *Journal of General Physiology*. **90**:427-449.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre R. and Phillips, M. 1985. Charibdotoxin, a protein inhibitor of single  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-319.
- Moczydlowski, E., Alvarez, O., Vergara, C., and Latorre, R. 1985. Effect of phospholipid surface charge on the conductance and gating of a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*. **83**: 273-282.
- Moczydlowski, E. and Latorre R. 1983. Gating kinetics of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent  $Ca^{2+}$  binding reactions. *J. Gen. Physiol.* **82**: 511-42.
- Morales, B., Labarca, P., and Bacigalupo, J. 1995. A ciliary  $K^+$  conductance sensitive to charibdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett.* **359**: 41-44.
- Moss, G.W.J., Marshall, J., and Moczydlowski, E.G. 1996. Hypothesis for serine proteinase-like domain at the COOH terminus of *slowpoke* calcium-activated potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **108**: 473-484.
- Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., and Lederer, W.J. 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*. **270**: 633-636.
- Nelson, M.T., Patlak J.B., Worley, J.F., Standen N.B. 1990. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* **259**: (1 Pt 1), C3-C18.
- Neyton, J. 1996. A  $Ba^{2+}$  chelator suppresses long shut events in fully activated high-conductance  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel. *Biophys. J.* **71**: 220-226.
- Neyton, J., and Miller, C. 1988. Potassium blocks barium permeation through a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel. *J. Gen. Physiol.* **92**: 549-567.
- Noceti, F., Baldelli, P., Wei, X., Qin, N., Toro, L., Birnbaumer, L., and Stefani, E. 1996. Effective gating charges per channel in voltage dependent  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels. *J. Gen. Physiol.* **108**: 143-155.
- Noda M., Ikeda, T., Kayano, T., Susuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M.,

Takahashi, H., and Numa. S. 1986. Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320: 188-192.

Noda M., Shimizu S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamina., M., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida. Y., Miyata, T. and Numa. S. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-7.

Oberhauser, A., Alvarez, O. and Latorre, R. 1988. Activation by divalent cations of a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel from skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 92: 67-86.

Pallanck, L., and Ganetzky, B 1994. Cloning and characterization of human and mouse homologs of the *Drosophila* calcium-activated potassium channel gene, *slowpoke*. *Human Mol. Gen.* 3: 1239-1243.

Pallotta B.J. 1985. N-Bromoacetamide removes a calcium dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channel in rat skeletal muscle *J. Gen. Physiol.* 86: 601-611.

Pallotta, B.S., Magleby, K.L. and Barret, J.N. 1981. Single channel recording of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in rat muscle cell culture. *Nature (Lond)*. 293: 471-474.

Papazian D.M. Schwarz T.L. Tempel, B., Jan Y. N. Jan L. Y. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753.

Papazian, D.M., Shao, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y. and Wainstock, D.H. 1995. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker  $K^+$  channels. *Neuron* 14: 1293-1301.

Papazian D.M. Timpe L.C. Jan Y.N. Jan L.Y. 1991. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channels by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-10.

Pérez, G., Lagrutta, A., Adelman, J.P., and Toro, L. 1994. Reconstitution of expressed  $K_{Ca}$  channels from *Xenopus* oocytes into lipid bilayers. *Biophys. J.* 66: 1022-1027.

Perozo E., Santacruz-Tolosa L., Stefani E., Bezanilla F. and Papazian D. 1994. S4 mutations alter gating currents of shaker K channels. *Biophys. J.* 66: 345-54.

Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel V., Patten, C.D., and Montal, M. 1995. Mutation of conserved negatively charged residues in the S2 and S3 transmembrane segments of

a mammalian  $K^+$  channel selectively modulates channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **92**: 9422-9426.

Ranganathan, R. Lewis, J.H., and MacKinnon, R. **1996**. Spatial localization of the  $K^+$  channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron*. **16**: 131-139.

Reinhart, P.H., Chung, S., and Levitan, I.B. **1989**. A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron* **2**: 1031-1041.

Robitaille, R., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., and Charlton, M.P. **1993**. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11**: 645-655.

Saito, M., and Wu, C-F. **1991**. Expression of ion channels and mutational effects in giant *Drosophila* neurons differentiated from cell division-arrested embryonic neuroblasts. *J. Neurosci.* **11**: 2135-2150.

Salkoff, L. **1983**. *Drosophila* mutants reveal two components of fast outward current. *Nature* **302**: 249-251.

Salomao, L., Wark, G., Dubinsky, W.P., and Schultz, S.G. **1992**. Effect of trypsin on a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel reconstituted into planar phospholipid bilayers. *Am. J. Physiol.* **262**: C971-C974.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. **1989**. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Press. Chap. 13.

Schneider, M.F., and Chandler, W.K. **1973**. Voltage-dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature (Lond)* **242**:244-246.

Schoenmakers, T.J., Visser, G.J., Flik, G., and Theuvenet, A.P.R. **1992**. Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques*. **12**: 870-874; 876-879.

Schoppa N.E., McCormack, K., Tanouye M.A. and Sigworth F.J. **1992**. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* **255**: 1712-5.

Schreiber, M., and Salkoff, L. **1997**. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* **73**: 1355-1363.

Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F.,

and Grignon, C. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.

Seoh, S.-A., Papazian, D., and Bezanilla, F. 1997. Simultaneous neutralization of four voltage-sensing residues in *Shaker* K<sup>+</sup> channels reduces the apparent gating charge per channel by about 80%. *Biophys. J.* 72: A28 (Resumen)

Seoh, S.-A., Sigg, D., Papazian, D., and Bezanilla, F. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K channel. *Neuron* 16: 1159-1167.

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

Sheng, M., and Wyszynski, M. 1997. Ion channel targeting in neurons. *Bioessays* 19: 847-853.

Sigg, D., and Bezanilla, F. 1997. Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J. Gen. Physiol.* 109: 27-39.

Silberberg, S.D., Lagrutta, A., Adelman, J.P., and Magleby, K.L. 1996. Wanderlust kinetics and variable Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of *Drosophila*, a large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, expressed in oocytes. *Biophys. J.* 70: 2640-2651.

Singh, S., and Wu, C.F. 1989. Complete separation of four potassium currents in *Drosophila*. *Neuron* 2: 1325-1329.

Solaro, C.R., Ding, J.P., Li, Z.W. and Lingle, C.J. 1997. The cytosolic inactivation domains of BK<sub>i</sub> channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers. *Biophys. J.* 73: 819-830.

Solaro, C.R., and Lingle, C.J. 1992. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257: 1694-1698.

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

Starace, D., Stefani, E., and Bezanilla, F. 1998. Histidine scanning mutagenesis indicates full translocation of two charges of the *Shaker* K channel voltage sensor. *Biophys. J.* 74: A265 (Resumen)

Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R., and Toro, L. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channel (*hsl*). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **94**: 5427-5431.

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

Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A. and Numa, S. 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and *slowpoke* calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* **336**: 134-139.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313-318.

Tempel, B., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science* **237**: 770-775.

Tiwari-Woodruff, S.K., Schulteis, C.T., Mock, A.F., and Papazian, D.M. 1997. Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of *Shaker*  $\text{K}^+$  channel subunits. *Biophys. J.* **72**: 1489-1500.

Toro, L. and Scornik, F. 1991. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}$  channels from coronary smooth muscle. "Ion Channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells." Eds.: Sperelakis and Kuriyama; pags. 111-124

Toro, L., Wallner, M., Meera, P., and Tanaka, Y. 1998. Maxi  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , a unique member of voltage-gated  $\text{K}$  channel superfamily. *NIPS* (En prensa).

Tseng-Crank, J., Foster, C.D., Krause, J.D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T.J., and Reinhart, P.H. 1994. Cloning, expression and distribution of functionally distinct  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel isoforms from human brain. *Neuron* **13**: 1315-1330.

Vergara, C., and Latorre, R. 1983. Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence of a  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  blockade. *J. Gen. Physiol.* **82**: 543-568.

Vergara, C., Moczydlowski, E. and Latorre R. 1984. Conduction, blockade and gating in a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biophys. J.* **45**: 73-76.

Wallner, M., Meera, P., Ottolia, M., Kaczorowski, G., Latorre, R., Garcia, M.L., Stefani, E., and Toro, L. 1995. Cloning, expression and modulation by a  $\beta$ -subunit of a human maxi  $K_{Ca}$  channel cloned from human myometrium. *Receptors and Channels* 3: 185-199.

Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. 1996. Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in maxi  $K_{Ca}$  channels: and additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 93: 14922-14927.

Wei, A., Jegla, T., and L. Salkoff. 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35: 805-829.

Wei, A., Solaro, C.R., Lingle, C.J, and Salkoff, L. 1994. Calcium sensitivity of BK-type  $K_{Ca}$  channels determined by a separable domain. *Neuron* 13: 671-681.

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

Wong, B.S., Lecar, H. and Adler, M. 1982. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Biophys. J.* 39: 313-17.

Wu, C-H. and Ganetzky, B. 1992. Neurogenetics studies of ion channels in *Drosophila*. "Ion Channels Volume 3. Ed.: Toshio Narahashi. Plenum Press, New York. 261-314.

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

Yang, N., George, A.L.J., and Horn, R 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 16: 113-122.

## APÉNDICES

### I. Cálculo de la constante de disociación del complejo $Ba^{2+}$ -A18C6T.

La constante de disociación ( $K_d^{Ba}$ ) del complejo formado por  $Ba^{2+}$  y el éter corona quelante de  $Ba^{2+}$ , ácido (+)-18-corona-6-tetracarboxílico (A18C6T; ver figura 10, Métodos), no se encuentra descrita en la literatura. Para determinarla se realizó un experimento de titulación del  $Ba^{2+}$  con A18C6T, en donde la  $[Ba^{2+}]$  libre ( $[Ba^{2+}]$ ) se determinó a partir de una de las propiedades del bloqueo por  $Ba^{2+}$  interno del canal  $K_{Ca}$  hSlo (sección 2.2, Resultados):

$$\alpha = k_1 \cdot [Ba^{2+}] \quad (20)$$

en donde  $\alpha$ , la velocidad de establecimiento del bloqueo es directamente proporcional a la  $[Ba^{2+}]$ . La constante de velocidad  $\alpha$  se determinó a partir de la corriente remanente fraccional ( $f_r$ ) y de la constante de tiempo de la relajación de la corriente,  $\tau_D$ , según las siguientes expresiones (sección 2.2, Resultados):

$$\beta = f_r / \tau_D \quad (21)$$

$$\alpha = \tau_D^{-1} - \beta \quad (22)$$

Los experimentos se hicieron en presencia de  $1\mu M$  de  $Ba^{2+}$ . La  $[Ba^{2+}]$  en ausencia de A18C6T ( $[Ba^{2+}]_0$ ) es igual a la  $[Ba^{2+}]$  total ( $[Ba^{2+}]_T$ ), igual a  $1\mu M$ . En este caso:

$$\alpha_0 = k_{on} \cdot [Ba^{2+}]_0 \quad (I-1)$$

donde  $\alpha_0$  es la constante de velocidad de entrada al bloqueo en ausencia de A18C6T. En presencia de una concentración  $x$  cualquiera de A18C6T, la  $[Ba^{2+}] = [Ba^{2+}]_x$ . En este caso:

$$\alpha_x = k_{on} \cdot [Ba^{2+}]_x \quad (I-2)$$

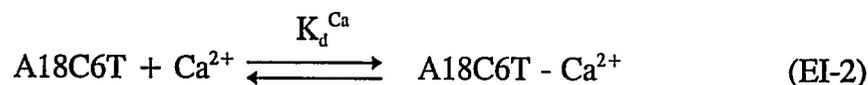
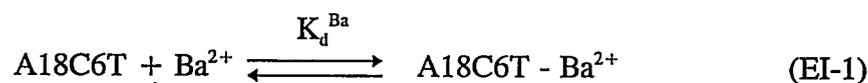
Al hacer la razón de las ecuaciones I-2 e I-1 tenemos:

$$\alpha_x / \alpha_0 = [Ba^{2+}]_x / [Ba^{2+}]_0 \quad (I-3)$$

de donde la  $[Ba^{2+}]$  a cualquier  $[A18C6T]$  se obtiene de:

$$[Ba^{2+}]_x = (\alpha_x / \alpha_0) \cdot [Ba^{2+}]_0 \quad (I-4)$$

El éter corona es capaz de quelar  $K^+$  con baja afinidad ( $K_d^K = 3,3 \cdot 10^{-6}$ , Dietrich, 1985). Como en el experimento la concentración total de  $K^+$  ( $[K^+]_T$ ) fue 110.000 veces mayor que la concentración total de  $Ba^{2+}$  ( $[Ba^{2+}]_T$ ;  $[K^+]_T = 110 \text{ mM}$ ;  $[Ba^{2+}]_T = 1 \text{ }\mu\text{M}$ ), la interacción del A18C6T con  $K^+$  debió ser considerada en el cálculo. Por otro lado, la  $[Ca^{2+}]_T$  usada en este experimento fue de  $100 \text{ }\mu\text{M}$ . Sin embargo el éter corona tiene alta afinidad por  $Ca^{2+}$  ( $K_d^{Ca} = 10^{-8}$ , Dietrich, 1985), por lo que esta interacción también debe ser tomada en cuenta en el cálculo de la  $K_d^{Ba}$ . Los equilibrios considerados fueron los siguientes:



donde  $K_d^{Ba}$ ,  $K_d^{Ca}$  y  $K_d^K$  son las constantes de disociación de los equilibrios EI-1, EI-2 y EI-3 respectivamente. A su vez, las constantes están definidas por:

$$K_d^{Ba} = [A18C6T] \cdot [Ba^{2+}] / [A18C6T - Ba^{2+}] \quad (I-5)$$

$$K_d^{Ca} = [A18C6T] \cdot [Ca^{2+}] / [A18C6T - Ca^{2+}] \quad (I-6)$$

$$K_d^K = [A18C6T] \cdot [K^+] / [A18C6T - K^+] \quad (I-7)$$

donde  $[A18C6T]$  es la concentración del éter corona libre,  $[Ba^{2+}]$ ,  $[Ca^{2+}]$  y  $[K^+]$  son las concentraciones de  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  libres, y  $[A18C6T - Ba^{2+}]$ ,  $[A18C6T - Ca^{2+}]$  y  $[A18C6T - K^+]$  son las concentraciones de los complejos del éter corona con  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  respectivamente.

Las concentraciones totales de los iones  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  están dadas por:

$$[Ba^{2+}]_T = [Ba^{2+}] + [A18C6T - Ba^{2+}] \quad (I-8)$$

$$[K^+]_T = [K^+] + [A18C6T - K^+] \quad (I-9)$$

$$[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}] + [A18C6T - Ca^{2+}] \quad (I-10)$$

de donde se obtienen las concentraciones de cada uno de los complejos:

$$[A18C6T - Ba^{2+}] = [Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}] \quad (I-8a)$$

$$[A18C6T - K^+] = [K^+]_T - [K^+] \quad (I-9a)$$

$$[A18C6T - Ca^{2+}] = [Ca^{2+}]_T - [Ca^{2+}] \quad (I-10a)$$

La concentración total de A18C6T ( $[A18C6T]_T$ ) es:

$$[A18C6T]_T = [A18C6T] + [A18C6T - Ba^{2+}] + [A18C6T - K^+] + [A18C6T - Ca^{2+}] \quad (I-11)$$

Utilizando la ecuación I-5 para obtener  $[A18C6T]$  y las ecuaciones I-8a, I-9a e I-10a para reemplazar la concentración de los complejos de éter corona con  $Ba^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  respectivamente, en I-11, tenemos:

$$[A18C6T]_T = K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) / [Ba^{2+}] + ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + ([K^+]_T - [K^+]) + ([Ca^{2+}]_T - [Ca^{2+}]) \quad (I-12)$$

que se simplifica a:

$$[A18C6T]_T = ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) \cdot (K_d^{Ba} / [Ba^{2+}] + 1) + ([K^+]_T - [K^+]) + ([Ca^{2+}]_T - [Ca^{2+}]) \quad (I-12a)$$

En este punto es necesario expresar las concentraciones de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en función de constantes y cantidades conocidas. A partir de las constantes de disociación del  $Ba^{2+}$  y del  $K^+$  (ecuaciones I-5 e I-7) tenemos:

$$K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) / [Ba^{2+}] = K_d^K \cdot ([K^+]_T - [K^+]) / [K^+] \quad (I-13)$$

$$K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) \cdot [K^+] = K_d^K \cdot [K^+]_T \cdot [Ba^{2+}] - K_d^K \cdot [Ba^{2+}] \cdot [K^+] \quad (I-13a)$$

y reordenando:

$$[K^+] \cdot \{K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^K \cdot [Ba^{2+}]\} = K_d^K \cdot [K^+]_T \cdot [Ba^{2+}] \quad (I-13b)$$

por lo tanto la  $[K^+]$  libre es:

$$[K^+] = K_d^K \cdot [K^+]_T \cdot [Ba^{2+}] / \{K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^K \cdot [Ba^{2+}]\} \quad (I-14)$$

De un modo análogo, la concentración de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]$ ) se encontró a partir de las constantes de disociación del  $Ba^{2+}$  y del  $Ca^{2+}$  (ecuaciones I-5 e I-6):

$$K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) / [Ba^{2+}] = K_d^{Ca} \cdot ([Ca^{2+}]_T - [Ca^{2+}]) / [Ca^{2+}] \quad (I-15)$$

$$[Ca^{2+}] \{K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^{Ca} \cdot [Ba^{2+}]\} = K_d^{Ca} \cdot [Ca^{2+}]_T \cdot [Ba^{2+}] \quad (I-15a)$$

de donde la  $[Ca^{2+}]$  es:

$$[Ca^{2+}] = K_d^{Ca} \cdot [Ca^{2+}]_T \cdot [Ba^{2+}] / \{K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^{Ca} \cdot [Ba^{2+}]\} \quad (I-16)$$

Reemplazando las ecuaciones I-14 e I-16 en I-12a se obtiene una expresión que es una función de las concentraciones iónicas totales, conocidas ( $[Ba^{2+}]_T = 1 \mu M$ ;  $[K^+]_T = 110 \text{ mM}$ ,  $[Ca^{2+}]_T = 100 \mu M$ ), de la  $[A18C6T]_T$  (variable), de la  $[Ba^{2+}]$  libre (determinada a partir de la ecuación I-4) y de la constante  $K_d^{Ba}$  a calcular:

$$\begin{aligned} & ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) \cdot (1 + K_d^{Ba} / [Ba^{2+}]) \\ & + [K^+]_T \cdot \{1 - (K_d^K \cdot [Ba^{2+}]) / [K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^K \cdot [Ba^{2+}]]\} \\ & + [Ca^{2+}]_T \cdot \{1 - (K_d^{Ca} \cdot [Ba^{2+}]) / [K_d^{Ba} \cdot ([Ba^{2+}]_T - [Ba^{2+}]) + K_d^{Ca} \cdot [Ba^{2+}]]\} \\ & - [A18C6T]_T = 0 \end{aligned} \quad (I-17)$$

El valor de la  $K_d^{Ba}$  se obtuvo buscando numéricamente aquel valor que hiciera la ecuación I-17 igual a 0, para las distintas concentraciones de A18C6T usadas en la titulación. El valor obtenido fue:  $K_d^{Ba} = 1,6 \cdot 10^{-10} \text{ (M)}$ .

## II. Pendiente límite.

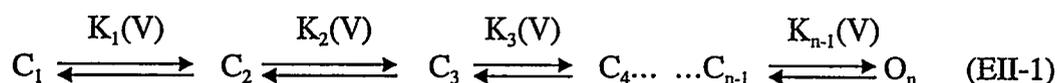
El número total de cargas de compuerta ( $z_{eq\lim}$ ) fue obtenido a partir del ajuste de la ecuación 24 (Resultados) a los datos de  $P_o$  en función del potencial, en el intervalo de probabilidades de 0,001 a 0,01:

$$P_o = A \cdot \exp [z_{eq\lim} \cdot F \cdot V / (R \cdot T)] \quad (27)$$

Esta expresión es la aproximación monoexponencial de la distribución de Boltzmann en el límite para potenciales muy negativos, donde  $A$  es la amplitud de la exponencial.

Con este fin los datos fueron graficados con la ordenada en escala logarítmica, pues a probabilidades bajas ( $P_0 \approx 0,01$  a  $0,001$ ) la relación  $P_0$ - $V$  graficada en esta forma se hace lineal.

Esta aproximación proviene del trabajo de Almers (1978) en que demuestra que en un modelo lineal dependiente del potencial, con  $n$  estados en donde sólo el último estado es un estado abierto:



se cumple que la pendiente de la curva de probabilidad del estado abierto ( $P_0$ ) en función del potencial, graficada con una ordenada logarítmica alcanza un máximo (*pendiente límite*) que es independiente del número de estados, cuando la  $P_0$  tiende a 0. En esta condición, la pendiente es proporcional a la suma de la carga de compuerta que se mueve en todas las transiciones (carga total).

La  $P_0$  para el esquema EII-1 se define como:

$$P_0 = O / (C_1 + C_2 + C_3 + \dots \dots + C_{n-1} + O_n) \quad (\text{II-1})$$

$$P_0 = 1 / (1 + C_1/O + C_2/O + C_3/O + \dots \dots + C_{n-1}/O) \quad (\text{II-2})$$

Podemos definir las constantes de equilibrio de las transiciones del esquema

EII-1 como:

$$K_i = C_i / C_{i+1} = \exp -(z_i \cdot (V - V_i) \cdot a) \quad (\text{II-3})$$

donde  $a = F / (R \cdot T)$ ,  $z_i$  es la carga de compuerta que se mueve en la transición  $i$ , y  $V_i$  es el potencial en que  $K_i = 1$ .

Las constantes de equilibrio para las transiciones mostradas son:

$$K_1(V) = K_1 = C_1 / C_2 \quad (\text{II-4})$$

$$K_2(V) = K_2 = C_2 / C_3 \quad (\text{II-5})$$

$$K_3(V) = K_3 = C_3 / C_4 \quad (\text{II-6})$$

$$K_{n-1}(V) = K_{n-1} = C_{n-1} / O_n \quad (\text{II-7})$$

De estas expresiones se puede obtener respectivamente:

$$C_1 = K_1 \cdot C_2 \quad (\text{II-4a})$$

$$C_2 = K_2 \cdot C_3 \quad (\text{II-5a})$$

$$C_3 = K_3 \cdot C_4 \quad (\text{II-6a})$$

$$C_{n-1} = K_{n-1} \cdot O_n \quad (\text{II-7a})$$

Reemplazando sucesivamente las expresiones II-4a, II-5a, II-6a y II-7a en la ecuación

II-2:

$$P_0 = 1 / (1 + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \dots \dots \cdot K_{n-1} + K_2 \cdot K_3 \cdot \dots \dots \cdot K_{n-1} + K_3 \cdot \dots \dots \cdot K_{n-1} + \dots \dots + K_{n-1}) \quad (\text{II-8})$$

De la definición de las constantes (ecuación II-3), la expresión queda:

$$P_0 = 1 / \{1 + [\exp -(z_1 \cdot (V - V_1) \cdot a) \cdot \exp -(z_2 \cdot (V - V_2) \cdot a) \cdot \exp -(z_3 \cdot (V - V_3) \cdot a) \cdot \dots \dots \cdot \exp -(z_{n-1} \cdot (V - V_{n-1}) \cdot a)] + [\exp -(z_2 \cdot (V - V_2) \cdot a) \cdot \exp -(z_3 \cdot (V - V_3) \cdot a) \cdot \dots \dots \cdot \exp -(z_{n-1} \cdot (V - V_{n-1}) \cdot a)] + \dots \dots \dots\}$$

$$\begin{aligned} & \exp -(z_3 \cdot (V - V_3) \cdot a) \cdot \dots \dots \exp -(z_{n-1} \cdot (V - V_{n-1}) \cdot a)] + \dots \\ & \dots + \exp -(z_{n-1} \cdot (V - V_{n-1}) \cdot a) \} \end{aligned} \quad (\text{II-9})$$

expresión que se puede reordenar a:

$$\begin{aligned} P_0 = 1 / \{ & 1 + K'_1 \cdot [\exp -(z_1 + z_2 + z_3 + \dots \dots z_{n-1}) \cdot V \cdot a + \\ & K'_2 \cdot [\exp -(z_2 + z_3 + \dots \dots z_{n-1}) \cdot V \cdot a + \\ & K'_3 \cdot [\exp -(z_3 + \dots \dots z_{n-1}) \cdot V \cdot a + \dots \\ & \dots + K'_{n-1} \cdot [\exp -(z_{n-1}) \cdot V \cdot a \end{aligned} \quad (\text{II-10})$$

donde  $K'_i = \exp -(a \cdot \Sigma (z_i \cdot V_i))$ . Cuando  $V \rightarrow -\infty$ , el primer término exponencial del denominador de la ecuación II-10 crece a una tasa mayor que el resto de los términos.

Estos se pueden despreciar en relación al primero, y la expresión se simplifica a (si  $V \rightarrow -\infty$ ):

$$P_0 = 1 / \{ K'_1 \cdot [\exp -(z_1 + z_2 + z_3 + \dots \dots z_{n-1}) \cdot V \cdot a] \} \quad (\text{II-11})$$

o

$$P_0 = K'_1 \cdot [\exp (z_1 + z_2 + z_3 + \dots \dots z_{n-1}) \cdot V \cdot a] \quad (\text{II-12})$$

En esta condición  $P_0 \rightarrow 0$ . Es decir, a  $P_0$  bajas, la carga de compuerta movida tiende a la carga total:

$$z_{eq} = z_1 + z_2 + z_3 + \dots \dots z_{n-1} \quad (\text{II-13})$$

Adicionalmente, si obtenemos el logaritmo de la ecuación II-12, tenemos:

$$\ln P_0 = \ln \{ K'_1 \cdot \exp (z_{eq} \cdot V \cdot a) \} \quad (\text{II-14})$$

$$\ln P_0 = \ln K'_1 + (z_{eq} \cdot V \cdot a) \quad (\text{II-14a})$$

La pendiente de esta expresión es:

$$d(\ln P_o) / dV = d(z_{eq} \cdot V \cdot a) / dV \quad (\text{II-15})$$

$$d(\ln P_o) / dV = (z_{eq} \cdot F \cdot / (R \cdot T)) \quad (\text{II-16})$$

Es decir, a valores infinitesimales de  $P_o$ , la pendiente tiende a un máximo que es igual a la carga total  $z_{eq}$  ( $z_{eq\text{lim}}$ ). El valor de  $z_{eq}$  se puede calcular de los datos experimentales a partir de la ecuación II-16 como:

$$z_{eq} = [R \cdot T / F] \cdot d(\ln P_o) / dV \quad (\text{II-17})$$

o:

$$z_{eq} = [R \cdot T / F] \cdot (1 / P_o) \cdot d(P_o) / dV \quad (\text{II-18})$$

que se aproxima a:

$$z_{eq} = [R \cdot T / F] \cdot (1 / P_o) \cdot \Delta P_o / \Delta V \quad (\text{II-19})$$

### III. Inhibición de la unión de IbTX por $\text{Na}^+$ .

El ensayo de unión de iberitoxina (IbTX) a los canales *hSlo* expresados en oocitos, se hizo en un medio cuya concentración de  $\text{Na}^+$  es 96 mM. Koschak y col. (1997) describieron que el  $\text{Na}^+$  inhibe la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]IbTX-D19Y/Y36F con una constante de inhibición de 28 mM y un número de Hill de 1. Para estimar la fracción de canales unidos a IbTX ( $f_{T-C}$ ), se supuso que el  $\text{Na}^+$  y la IbTX compiten por el mismo sitio en el canal, de acuerdo al siguiente esquema:



y tomando en cuenta la definición de  $K_1$ :

$$K_1 = [Na^+] \cdot [C] / [Na^+-C] \quad (III-7)$$

obtenemos la concentración del complejo  $[Na^+-C]$ :

$$[Na^+-C] = [Na^+] \cdot [C] / K_1 \quad (III-8)$$

reemplazando ahora las ecuaciones III-6 y III-8 en III-5, para obtener:

$$f_{IbTX-C} = \frac{1}{1 + (K_D / [IbTX]) + ([Na^+] \cdot [C] \cdot K_D / (K_1 [IbTX] \cdot [C]))} \quad (III-9)$$

que luego de simplificar y ordenar queda como la ecuación 9 de los métodos (ecuación de Gaddum):

$$f_{T-C} = 1 / [1 + K_D / [IbTX] \cdot (1 + [Na^+] / K_1)] \quad (9)$$

Esta expresión permite calcular el límite inferior de la fracción de canales con toxina unida,  $f_{T-C}$ , considerando que la unión de un ion  $Na^+$  imposibilita totalmente al canal de unir toxina.