

03081
7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS TRK Y
TOK1 DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LA
LEVADURA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A
CARLOS) SALDAÑA GUTIERREZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ANTONIO PEÑA DIAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Instituto de
Fisiología Celular de la UNAM, en los
laboratorios de los Doctores: Antonio Peña,
Robero Coria, David Naranjo y Luis Vaca.
Bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz
y co-dirección del Dr. Luis Vaca
Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Peña. Por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis

A los Doctores Alicia González Manjarrez, Roberto Coria Ortega, Luis Vaca Domínguez y Antonio Peña Díaz. Por que las discusiones de trabajo con ustedes me permitió enriquecer mi trabajo y mi formación. GRACIAS.

A los Doctores:

Antonio Peña Díaz

Luis Vaca Domínguez

David Naranjo Donoso

Froylan Gómez Laguna

Rogelio Arellano Ostoa

Wilhelm Hansber Torres

Juan Carlos Gómora Martínez

Mil gracias por el tiempo que dedicaron a la lectura de este manuscrito. Sus comentarios y sugerencias enriquecieron este trabajo.

A la Doctora Verónica Morales Tlalpan por su gran apoyo durante mi formación.
GRACIAS.

A los técnicos académicos:

Dr. Jorge Ramírez Salcedo

Dra. Alma Saviñón Tejeda

M en C. Alicia Sampieri

QFB. Beatriz Aguirre

Gracias por su excelente apoyo técnico

A las Sras. Marisela Bolaños, Gloria Salgado y al Sr. Miguel Ángel Hernández.
Gracias porque su trabajo facilita el nuestro.

A las Unidades de Biología Molécula y Computo de esta institución.

A la DGAPA, por distinguirme con una beca para realizar mis estudios de posgrado.

A la máxima casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México.

Quiero agradecer profundamente a mis maestros los doctores:

Antonio Peña
Luis Vaca
Roberto Coria
Alicia González
David Naranjo
Verónica Morales
Manuel Miranda
Jorge Ramírez

A mis amigos, los más geniales:

Fernando Rosas, Juan Fornoni, Juan Carlos Flores, Carlos Martorel, Andrea Martínez,
Eduardo Mendoza.

Aimeé Ibelles y Omar Zendejas

Cuahutemoc Gómez

Benito y Ricardo

A mis alumnos:

Velia, Nancy, Octavio, David y Hugo

A mis compañeros de laboratorio: Los Coria, Los Naranjo, Los Vaca, etc

GRACIAS por el café, la música y las risas, ah! y por tolerar mi desorden

A mi familia, gracias por entenderme y apoyarme

CONTENIDO

Abreviaturas
Resumen
Abstract

SECCIÓN I

Proteínas de membrana plasmática de la levadura

Manuscrito 1. *La regulación de los niveles de iones en la levadura. Las proteínas de la membrana plasmáticas involucradas.*

¿Qué es un canal iónico?

Canales de potasio

¿Cómo se determina la dirección de la corriente en los canales de potasio?

Algunos canales de potasio se asocian en tetrámeros para realizar sus funciones de selectividad y de permeación

¿Qué se conoce de la estructura del poro de los canales de potasio?

Clasificación de los canales de potasio

Canales de potasio voltaje-dependientes 1P/6TM

¿Cómo permean los iones potasio a través de los canales voltaje-dependientes?

Activación voltaje-dependiente de la corriente de potasio

Mecanismos inactivación

Canales de potasio rectificadores entrantes 1P/2TM

Canales de potasio con dos regiones de poro en tandem 2P/4TM

SECCIÓN II

Kluyveromyces lactis como modelo alternativo para el estudio de los transportadores

Hipótesis

Objetivo

Objetivos Particulares

Resultados I

Manuscrito 2. *The Klrk gene encodes a low affinity transporter of the K⁺ uptake system in the budding yeast Kluyveromyces lactis.*

El caso de los canales iónicos en la levadura

Hipótesis

Objetivo

Objetivos Particulares

Resultados II

Manuscrito 3 *Splitting the two-pore-domains from TOK1 results in two cationic channels with novel functional properties.*

SECCIÓN III

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

TOK1A y TOK1B son canales catiónicos no selectivos.

TOK1, TOK1A y TOK1B muestran sensibilidad a pH extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

La técnica de fijación de voltaje.

Fijación de voltaje con dos electrodos (*Two-electrodes voltage clamp*)

La técnica de fijación de voltaje en parche (*Patch clamp*)

El sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Aislamiento de ovocitos por cirugía e inyección de RNAm.

APÉNDICE

PRÓLOGO

Los mecanismos de transporte de potasio en la levadura no han sido completamente esclarecidos. Si bien es cierto que varias proteínas de membrana han sido caracterizadas, el papel de las proteínas involucradas con el movimiento de potasio aún es desconocido. Este trabajo tiene la finalidad de plantear algunas de las incógnitas que prevalecen en el área de transporte del potasio en la levadura, así como el de resolver algunas de ellas. Para ello se utilizaron los siguientes modelos de estudio: levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, los sistemas de expresión heteróloga de ovocitos de *Xenopus laevis* y las líneas celulares de mamífero CHO y HEK293.

La presentación de este trabajo se hace en tres secciones, cada una de ellas incluye un trabajo publicado en revistas con comité editorial. Se eligió este formato de tesis, como una forma alternativa que resultara poco repetitiva de los resultados y discusiones plasmadas en los artículos publicados. Considero que se mantiene un formato legible y bajo el control del método científico; es decir, a cada parte previa a la presentación de los resultados, le antecede una hipótesis así como los objetivos generales y los objetivos particulares que se persiguieron en cada uno de los trabajos. Al finalizar las secciones de resultados, se incluye una discusión general donde se mencionan las aportaciones de cada uno de los trabajos, tratando de integrarlos en el contexto actual en el área de transportadores y canales. De igual manera se incluyen las perspectivas que se desprenden de cada uno de los trabajos.

La sección I comprende una revisión general de los aspectos hasta ahora conocidos en la regulación de los niveles de iones en la levadura, tomando como ión principal al potasio. Por sus características, esta sección ha sido utilizada como una introducción general a esta tesis. Posteriormente se incluyen algunos aspectos básicos de la estructura y biofísica de los canales de potasio.

La sección II hace referencia a los resultados obtenidos durante el posgrado e incluye dos trabajos publicados en revistas del área de levaduras, de transportadores y canales.

La sección III comprende las discusiones y perspectivas de cada uno de los trabajos.

Finalmente, se incluyen a manera de apéndice, las metodologías más relevantes utilizadas en el trabajo experimental de esta tesis.

Es importante señalar que el orden de los trabajos que se presentan, corresponde al orden cronológico como fueron desarrollados. Cada trabajo es el esfuerzo de varias personas las cuales aparecen como co-autores o en los agradecimientos de cada manuscrito en particular.

Carlos Saldaña, 2002

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ATP	Adenosina trifosfatada
[ion]	Concentración(es) del ión
[ion] _i	Concentración(es) interna del ión
[ion] _e	Concentración(es) externa del ión
ASCII	Código Americano Estándar para el cambio de Información
CHO	Línea celular de ovario de hamster
Da	Daltones
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiamintetraacético
E _k	Potencial de reposo para potasio
GHK	Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazin-N'-(2-Etanosulfónico)
HEK293	Línea celular de riñón de humano
HOMOPIPES	Ácido Homopiperazina-N,N'-bis-(2-Etanosulfónico)
I	Corriente eléctrica
K ⁺	Ión Potasio
Kha1	Intercambiador H ⁺ / K ⁺
<i>K. lactis</i>	Especie de levadura <i>Kluyveromyces lactis</i>
K1TRK1	Transportador de potasio de baja afinidad de <i>Kluyveromyces lactis</i>
MES	Ácido [2-N-Morfolino] etanosulfónico
pcDNA3	Vector lanzadera de expresión para células de mamífero
P _{ion}	Permeabilidad relativa del ión
PS	Pico siemens (unidad de conductancia eléctrica)
pYES2	Vector lanzadera de expresión para levaduras
<i>S. cerevisiae</i>	Especie de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEA	Tetraetilamonio
TM	Cruce transmembranal
TOK1	Canal rectificador de salida de potasio
TOK1A	Canal rectificador de entrada catiónico no selectivo 1P/6TM
TOK1B	Canal rectificador de entrada catiónico no selectivo 1P/2TM
TRK1	Transportador de potasio de alta afinidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TRK2	Transportador de potasio de baja afinidad
V	Voltaje
1P/6TM	Nomenclatura para canales de potasio con 1 poro y 6 cruces transmembranales
1P/2TM	Nomenclatura para canales de potasio con 1 poro y 2 cruces transmembranales
2P/8TM	Nomenclatura para canales de potasio con 2 poros y 8 cruces transmembranales
2P/4TM	Nomenclatura para canales de potasio con 2 poros y 4 cruces transmembranales

RESUMEN

Los mecanismos que controlan el transporte de potasio a través de la membrana en la levadura no han sido completamente esclarecidos. En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito tres tipos de proteínas relacionadas con el transporte de potasio: dos transportadores de potasio Trk1 y Trk2, y un canal de rectificador de salida de potasio con dos dominios de poro en tándem (TOK1).

En el primer trabajo describimos la clonación y la caracterización del gen K1Trk1 de *Kluyveromyces lactis*. K1Trk1 muestra homología con los transportadores Trk2p y Trk1p. La cepa mutante *KltrkΔ*, presenta deficiencia en el transporte de potasio y requiere de más potasio para crecer. Mediante estudios cinéticos determinamos que tanto la cepa silvestre como la mutante *KltrkΔ*, sólo expresan un sistema de transporte de potasio de baja afinidad.

En el segundo trabajo se describe la contribución relativa de cada uno de los dominios de poro del canal TOK1 en los procesos de selectividad y de paso de iones potasio. Separamos cada uno de los dominios de poro y los expresamos de manera independiente, observándose que, cada uno de ellos es capaz de complementar a la cepa mutante *trk1Δtrk2Δ* de *S. cerevisiae*. Esto sugiere que cada uno de los dominios es funcional en la levadura. La expresión de cada dominio de poro en ovocitos de *Xenopus laevis*, muestra la expresión de dos canales catiónicos no selectivos con propiedades funcionales y farmacológicas novedosas.

Estos resultados proveen importantes hallazgos para el estudio de los sistemas de transporte en un contexto fisiológico en la levadura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The mechanisms controlling potassium transport across the plasma membrane in yeast cells have not been completely understood. Three types of potassium transport proteins have been described in *Saccharomyces cerevisiae*: two potassium transporters, Trk1p and Trk2p, and TOK1, a potassium channel with two pore domains in tandem originally identified in this yeast.

The first work reports the cloning and functional characterization of the Trk1 homologous gene (*K1trk1*) from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *K1Trk1p* shows higher homology to Trk2p than Trk1p. Disruption of *K1trk1* results in yeast cells with deficient potassium transport and increased potassium requirement for normal growth. Determination of kinetic parameters in the *K. lactis* wild type and *K1trk1* Δ strains indicate that this is a low affinity component of a major potassium uptake system.

The second work describes the relative contribution of each one of the two pore forming domains from TOK1 to its selectivity and gating. We split and expressed the pore domains separately or in combination. Expression of the two domains separately rescued a potassium transport-deficient yeast mutant, suggesting that each domain forms functional potassium-permeable channels in yeast. Expression of both domains independently in *Xenopus laevis* oocytes results in the appearance of cationic channels with novel functional and pharmacological properties.

All these results provide new insights into the role of these complex potassium transport systems in yeast, and their putative contribution to yeast physiology.

SECCIÓN I

Proteínas de membrana plasmática de la levadura

En este primer manuscrito abordamos el tema de la homeostasis de iones en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, destacando el papel del ion potasio. El presente trabajo surge como una actividad académica desarrollada durante el doctorado y por las características de la misma se incluye como una introducción general en esta tesis

Si bien es cierto que se han aislado y caracterizado cada una de las proteínas que a continuación se mencionan, aún no se ha desarrollado un modelo que explique satisfactoriamente y con suficiente detalle la homeostasis del potasio. En esta revisión señalamos el papel hasta ahora conocido de las proteínas relacionadas con la regulación de los iones a nivel de la membrana plasmática de la levadura.

Inicialmente presentamos una descripción de los aspectos teóricos básicos de los sistemas de transporte, planteando su función en los organismos e integrándola en un contexto de la teoría quimiosmótica propuesta por Peter Mitchell. Posteriormente describimos las proteínas que han sido caracterizadas y que se encuentran involucradas en la homeostasis del potasio.

La regulación de los niveles de iones en la levadura. Las proteínas de la membrana plasmáticas involucradas.

Carlos Saldaña y Antonio Peña

Publicado en *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* (1999) Vol 41 (3): 193-203



La Regulación de los Niveles de Iones en la Levadura las Proteínas de la Membrana Plasmática Involucradas

CARLOS SALDAÑA* Y ANTONIO PEÑA

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular Universidad Autónoma de México. Apartado Postal 70-242. 04510 México. D. F.

*Autor para la correspondencia: Tel 56-22-56-52. Fax. 56-22-56-30 E-mail csaldana@ifisiol.unam.mx

ABSTRACT. Potassium transport across a membrane mechanism in yeast cells have not been completely understood. Although many membrane proteins have been characterized, their specific role in potassium transfer is still unknown. Yeast cells typically maintain high intracellular concentrations through several potassium transport systems, making this system of study an optimal eukaryotic cell to explain potassium transport across membrane. Three types of protein related with potassium transport across membrane have been described: (1) the energy necessary for potassium accumulation (150 mM) is released by electrical gradients maintained across the membrane by H⁺-ATPase; (2) the second group of proteins related with potassium transport are two transporters, TRK1 and TRK2; (3) the third group are known a new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. Molecular Biology, Physiology and Electrophysiological experiments suggest a possible functional relationship among the three groups of proteins mentioned above. A mechanism of potassium transport dynamic across membrane in two species of yeast is proposed.

Key Words: Potassium Transport, Transporters, Ionic Channel, H⁺ / K⁺ interchange, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

RESUMEN. Los mecanismos de transporte de potasio en la levadura no han sido completamente esclarecidos. Si bien varias proteínas de membrana han sido caracterizadas, el papel de las proteínas involucradas con el movimiento de potasio aun es desconocido. Las levaduras típicamente mantienen una concentración alta de potasio en su interior a través de algunos sistemas de transporte. Tres tipos de proteínas se encuentran relacionados con el transporte de potasio a través de la membrana han sido descritos: (1) la energía necesaria para la acumulación de potasio (150mM) es generada por un gradiente eléctrico mantenido a través de la membrana plasmática por la H⁺-ATPasa; (2) el segundo grupo de proteínas relacionadas con el transporte de potasio son dos transportadores TRK1 y TRK2; (3) el tercer grupo conocido es una nueva familia de canales rectificadores salientes con dos dominios de poro en tándem. Experimentos de Biología Molecular, Fisiología y Electrofisiología sugieren una posible relación entre los tres grupos de proteínas mencionadas con anterioridad. Se propone un mecanismo de la dinámica del transporte de potasio a través de la membrana plasmática de dos especies de levadura.

Palabras clave. Transporte de iones, Transportadores, Canales iónicos, Intercambio H⁺ / K⁺. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

En el proceso de caracterización de la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado una variedad de proteínas relacionadas con el transporte de solutos y de iones. En este microorganismo, se ha descrito y caracterizado diferentes sistemas de transporte que han servido para estudiar fenómenos relacionados con alteraciones en las proteínas de la membrana plasmática.

El transporte en las membranas está mediado por proteínas, de las cuales hay distintos tipos: canales: facilitado-

res (transportadores, acarreadores y permeasas) y bombas.²⁰ En esta revisión resaltamos el papel, hasta ahora conocido, de varios tipos de proteínas involucradas con la regulación de los niveles de iones en la levadura *S. cerevisiae*. La primera, además de haber sido la primera proteína clonada, es la H⁺-ATPasa, la cual se encarga de acidificar el medio extracelular bombeando protones.²⁰ Su actividad genera un gradiente eléctrico a través de la membrana plasmática, el cual impulsa al sistema de proteínas (TRK1 y TRK2), cuya misión principal es la de transportar selectivamente potasio hacia el interior celular con diferentes afinidades.^{10,21} Otro tipo de proteínas corresponde a un canal



rectificador saliente de potasio en la membrana plasmática de la levadura, que se encarga de la salida de K^+ .²² Estudios detallados han demostrado que además de ser activado por la depolarización de la membrana plasmática también es activado por altas concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático. La función de esta proteína consiste en balancear las cargas durante el desplazamiento de protón acoplado al transporte de solutos.¹ Otro sistema reportado recientemente es el de un intercambiador H^+ /catión, que parece tener un papel en la regulación del pH interno de la levadura.²³

Por otra parte queremos resaltar la caracterización de otra especie de levadura; *Kluyveromyces lactis*, tiene una sola copia de varios de sus genes. Esto hace de esta especie un organismo más sencillo de estudiar desde el punto de vista genético.

En esta revisión pretendemos plantear las funciones específicas de cada una de las proteínas de membrana plasmática involucradas en la homeostasis del K^+ en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*, así como plantear algunas de las preguntas aún no esclarecidas.

LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE EN LOS ORGANISMOS, ¿QUÉ SON Y CUÁL ES SU PAPEL?

Todos los tipos celulares mantienen en su citoplasma una composición y una concentración de sustancias diferente del medio que las rodea, esto se debe en gran medida a la presencia de la membrana plasmática.

Hay dos tipos de transporte a través de la membrana, el transporte mediado y el no-mediado. El primero ocurre mediante una simple difusión de las moléculas que no tienen carga, y que se "disuelven" en la membrana y difunden libremente de un lado a otro de ella. El segundo ocurre mediante la acción de proteínas transportadoras específicas (que reciben el nombre de permeasas, portadores, translocasas, translocadores y transportadores).²⁴

Es sencillo explicar que la membrana celular impida el libre movimiento de macromoléculas; también se puede explicar que las moléculas polares o cargadas deban de mantenerse a un lado o del otro de la membrana, debido a la capa de solvatación que las rodea y aumenta su volumen. Es necesario para la célula que las moléculas o iones que se transporten a través de la membrana de un lado a otro, es decir, desde el lado donde se encuentran en menor concentración hacia aquel que está en mayor concentración.²⁵

El transporte a través de la membrana requiere atravesar la doble capa de fosfolípidos que la constituye. Una molécula grande, una molécula pequeña hidratada o un ion requiere de un sistema de transporte o un acarreador o un poro específico, capaces de permitir el paso de un lado a otro de la membrana. Estos sistemas de transporte, antes de permitir el paso de la sustancia deben de reconocerla y distinguirla de un sinnúmero de otras moléculas que se en-

cuentran disueltas en el medio extracelular e intracelular.

El transporte mediado pasivo o difusión facilitada. Es un sistema de transporte que consiste en el movimiento de moléculas específicas que fluyen desde una concentración elevada en un lado de la membrana a una concentración baja al otro lado de la membrana, de modo que la tendencia sea a equilibrar los gradientes de concentración. Los translocadores simples o facilitadores mueven sustancia a favor de su gradiente de concentración.²⁵

El transporte activo. Es aquel en el cual moléculas específicas se transportan desde una concentración baja a una elevada, es decir, en contra de gradiente de concentración. Un proceso endergónico como éste debe de estar acoplado a un proceso suficientemente exergónico para que sea favorable. Muchos de estos eventos se producen utilizando directamente la energía producida por la hidrólisis de ATP. Tal es el caso de las proteínas que mueven iones potasio (K^+) a través de la membrana. Este ion se encuentra en concentraciones intracelulares altas con respecto al medio extracelular.²⁵

EL PAPEL DEL POTENCIAL ELECTROQUÍMICO

La difusión de una sustancia a través de una membrana se parece, termodinámicamente hablando, a un equilibrio químico. Una diferencia en las concentraciones de las sustancias entre los dos lados de la membrana genera una diferencia de potencial químico:

$$\Delta G_a = G_a(\text{dentro}) - G_a(\text{fuera}) = RT \ln [(a) \text{ dentro} / (a) \text{ fuera}]$$

donde G_a es el potencial químico de a ; $(a) \text{ dentro}$ y $(a) \text{ fuera}$ se refieren a las concentraciones de esta especie dentro y fuera de la célula respectivamente; R es la constante de los gases; y T es la temperatura en grados Kelvin.

Por consiguiente, si la concentración de a fuera de la membrana es mayor que la de dentro, para la transferencia de a de fuera a dentro, ΔG_a será negativo y el flujo neto de a será hacia dentro. Sin embargo, si la concentración de a es mayor adentro que fuera, ΔG_a es positivo y el flujo neto de entrada de a tendrá lugar sólo si un proceso exergónico, tal como la hidrólisis de ATP, se acopla al mismo para hacer que la energía libre global pase a ser negativa.

Las diferencias de carga que se mueven a través de las membranas generan una diferencia de potencial eléctrico el cual puede ser determinado por la siguiente ecuación:

$$\Delta \psi = \psi (\text{dentro}) - \psi (\text{fuera})$$

donde $\Delta \psi$ se denomina potencial de membrana; ψ (dentro), es el potencial eléctrico del lado interno de la membrana; y ψ (fuera), es el potencial eléctrico del lado externo de la membrana.

MECANISMOS GENERALES DE TRANSPORTE

Dentro de los sistemas de transporte mediado, hay diferentes variantes, que fueron propuestas por Mitchell²⁸ en 1961, para tratar de definir los mecanismos implicados en cada caso.

Translocadores primarios. Son aquellos en los cuales el sistema de transporte está ligado directamente a una fuente de energía, como el ATP, o a las diferencias del potencial redox generado entre ambas caras de la membrana celular.

Translocadores secundarios. Son aquellos que aprovechan las condiciones existentes de diferencias de concentración de otros iones, o las diferencias del potencial eléctrico establecidas por los translocadores primarios. Dentro de éstos, se reconocen las siguientes categorías:

a) **Uniportador**, que supone el movimiento de una única molécula a la vez. Dentro de esta categoría puede haber el caso de moléculas o iones que se mueven según su diferencia de concentración o por diferencias del potencial eléctrico ambos lados de una membrana Fig. 1.

b) **Simportador**, que transporta simultáneamente dos moléculas o iones que pueden ser diferentes en la misma dirección. Habitualmente, en este caso, se aprovecha que un ion se encuentra a mayor concentración de un lado de una membrana, o es impulsado por una diferencia en el potencial eléctrico a ambos lados de ella, para mover a otra molécula o ion Fig. 1.

c) **Antiportador**, que transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en direcciones opuestas. También en este caso, lo habitual es que la energía para el movimiento de una molécula o ion sea proporcionada por la diferencia de concentración o del potencial eléctrico de la membrana Fig. 1.

Cuando se mueven partículas cargadas a través de la membrana, se habla del carácter eléctrico del transporte iónico, que se especifica además como:

a) **Electroneutro** (eléctricamente inexistente), cuando hay una neutralización simultánea de cargas, sea por un simporte de iones de carga opuesta o por un antiporte de

carga similar.

b) **Electrogénico**, cuando el proceso de transporte resulta en una separación de cargas a través de la membrana.

c) **Electroforético**, cuando una molécula o ion se mueven de acuerdo con la diferencia del potencial eléctrico a ambos lados de la membrana.

CANALES IÓNICOS

Como ya se dijo, el paso de iones a través de las membranas biológicas tiene un impedimento físico, ya que por su naturaleza eléctrica y por su capa de hidratación, se verían rechazados por el ambiente hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. Sin embargo, los iones son capaces de transitar a través de las membranas debido a la presencia de proteínas membranales especializadas en dicho movimiento, como los canales iónicos. Estos transportadores permiten una rápida difusión de los iones hacia el interior o exterior celular; diferente de los otros sistemas de transporte por la rapidez con la que permiten el paso, principalmente de iones, aprovechando las diferencias del potencial eléctrico a los lados de una membrana. Como transportadores que son, estas moléculas atraviesan la membrana, y por ello presentan tres dominios estructurales: el citoplasmático, el transmembranal y el extracelular; y un poro por donde pasan los iones. Con base en sus características y modo de acción, los canales iónicos se clasifican en cuatro grandes grupos: los receptores canal, los canales sensibles a voltaje, los canales sensibles a presión y los canales activados por proteínas G que habitualmente están relacionados con hormonas.²⁰

Los iones se distribuyen diferencialmente a través de las membranas, dando lugar a la generación de gradientes de naturaleza eléctrica y química. El establecimiento de gradientes tiene una significación biológica dando lugar a un sistema regulatorio de los movimientos intracelulares de los iones a los que se la ha denominado homeostasis iónica celular. De tal manera que en condiciones basales se tiene una concentración mayor de sodio y de calcio en el exte-

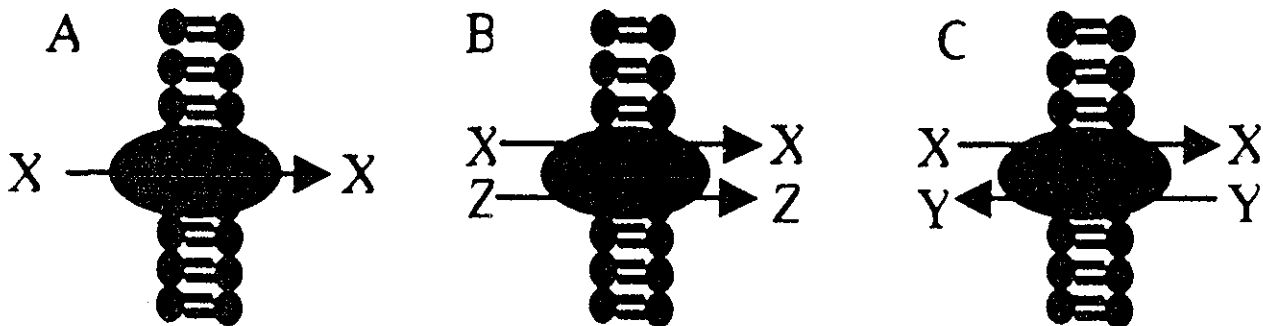


Figura 1 Esquema representativo de translocadores secundarios: Uniportadores (A), Simportadores (B) y Antiportadores (C). Estos se encuentran electrogénicamente asociados con los translocadores primarios que utilizan una fuente de energía tal como el ATP.

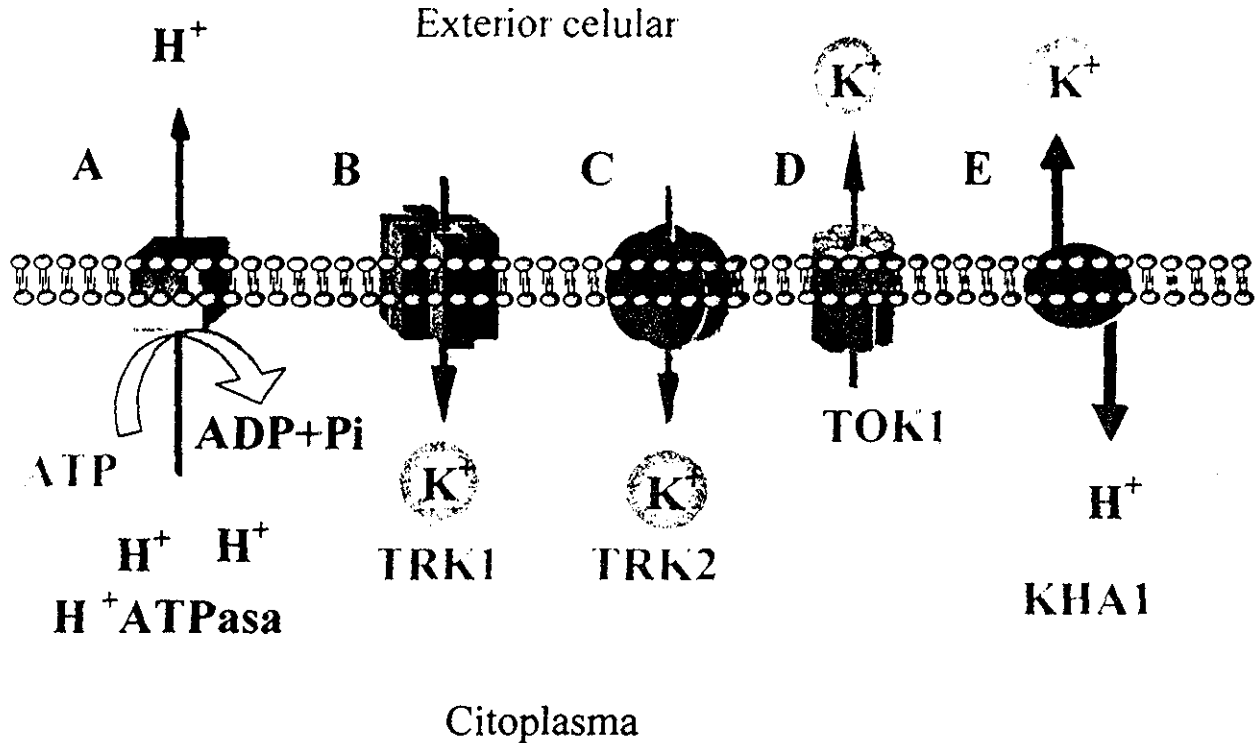


Figura 2. Modelo de membrana plasmática de levadura que involucra proteínas encargadas de la homeostasis del potasio. La H^+ ATPasa (A) se encuentra electrogénicamente acoplada a los sistemas de transporte de potasio TRK1 (B) y TRK2 (C). El canal rectificador saliente TOK1 (D) se encarga de la salida del potasio y finalmente, el intercambiador H^+/K^+ que regula el pH intracelular.

rior celular, mientras que el potasio se encuentra en mayor concentración en el interior.²⁵

Una característica importante al estudiar los canales iónicos es la capacidad que tienen para abrir y cerrar el poro (*gating*), ya que un poro abierto tiene una propiedad importante de permeabilidad selectiva, definida directamente con el radio de hidratación de cada ion y con la magnitud del gradiente electroquímico. Pero el "*gating*", además de los elementos estructurales de la proteína que lo representan, se puede analizar desde el punto de vista biofísico, realizando análisis cinéticos, en los cuales se pueden postular estados abiertos, cerrados y de transición. Este se lleva a cabo registrando los cambios que se observan en su capacidad para mover los iones, presentándose como corrientes eléctricas, pero aún contando con la historia de eventos, no es posible predecir el tiempo de apertura y de cierre, ni la magnitud de cada uno de ellos; es decir, los canales tienen un comportamiento que se apega a un modelo de Markov, en el que se contempla un estado de transición de primer orden. Mediante estos análisis, se encuentra que el tiempo de apertura de un canal puede cambiar por un pequeño pulso, de tal manera que se pueden tener más de un estado abierto; y la transición cerrado-abierto, tiene un curso de

tiempo multiexponencial (varios estados intermedios), de tal manera que se supone la existencia de pasos de primer orden.²⁰

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE IONES, Y EN ESPECIAL DEL K^+

Los estudios encaminados a elucidar el mecanismo del transporte de potasio en levadura, fueron iniciados por Conway⁹ y Rothstein,³⁸ quienes presentaron por primera vez pruebas sobre la existencia de un acarreador de cationes, a partir del análisis cinético del transporte. Posteriormente Mitchell²⁸ retomó los antecedentes hasta el momento existentes, proponiendo una teoría que en términos simplistas dice "*los cationes pueden penetrar a una estructura aislada por una membrana, solamente si dentro existe un potencial electroquímico negativo con respecto al exterior que provea el impulso requerido para la penetración del ion, el cual en muchos casos se mueve en contra de su gradiente de concentración*". El potasio es uno de estos iones que suele moverse en contra de su gradiente de concentra-

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



ción, pero a favor de un gradiente electroquímico. Los estudios realizados sobre el movimiento del potasio en las células de levadura han permitido establecer que la cantidad total de este ion que captan, guarda una relación con su concentración externa; es decir, a mayor concentración externa de K^+ , mayor es la cantidad total captada por la célula; pero también, mayor es la cantidad de H^+ expulsada al exterior celular. La comprensión del fenómeno del transporte de cationes, ha llevado al planteamiento de dos cuestiones; la primera se refiere a la posible existencia de un mecanismo de regulación de este sistema de transporte, y segundo, de las posibilidades reales de la existencia de tales sistemas de regulación.

LOS SISTEMAS PARA EL TRANSPORTE DE K^+ EN LA LEVADURA

Fuera de que los sistemas de transporte conocidos están constituidos por proteínas, con que velocidad se mueven y cual es su afinidad por las sustancias que transportan, es poco lo que se sabe acerca de su funcionamiento en detalle.

El tema de la afinidad es importante, pues hay diferencias en los sistemas de transporte en lo que se refiere a la concentración de las sustancias que se transportan. Este asunto toma importancia en el caso de los microorganismos como la levadura, que pueden sobrevivir en medios extremadamente pobres, y para ello necesitan de sistemas de transporte capaces de tomar con gran eficiencia moléculas de materiales nutritivos que requieren para sobrevivir y que se encuentran escasos en el medio. La energía para la acumulación de potasio en la levadura, se deriva del gradiente eléctrico generado a través de la membrana plasmática por la H^+ -ATPasa, lográndose una acumulación de potasio interna de 150 mM (Fig. 2).

En *Saccharomyces cerevisiae* se puede observar que, cuando crece en concentraciones bajas de potasio, expresa un sistema de transporte con una afinidad alta ($K_m \sim 0.15$ mM). Sin embargo, cuando crece en un medio rico de este catión, el sistema de transporte que utiliza para tomarlo tiene una afinidad menor ($K_m \sim 6.0$ mM).³⁷

Sin embargo, como trataremos más adelante, existe gran controversia alrededor del papel que juega cada proteína en el movimiento del potasio hacia el interior de la levadura. De hecho se ha especulado acerca del papel redundante de dos genes semejantes involucrados; es decir, puede ser que ambos genes en algún momento evolutivo codificaban para la misma proteína.³⁶

SISTEMAS Y MECANISMOS PROPUESTOS

Identificación de las proteínas implicadas y construcción de las primeras mutantes. En la membrana plasmática de la levadura el sistema de transporte de H^+ está ligado al de K^+ , por lo que se ha concluido que en la mem-

brana plasmática de la levadura se utiliza ATP como fuente de energía,³⁰ según el esquema de la figura 2. Se propuso que la levadura tiene un translocador primario, que consiste en una ATPasa (molécula que rompe ATP), que con la energía producida por la ruptura del ATP es capaz de bombear protones (iones de hidrógeno) al exterior de la célula, generando por una parte una diferencia de concentraciones de iones hidrógeno en el exterior, más ácido, que en el interior (más alcalino). Pero además, dado que los protones tienen carga positiva, se genera una diferencia de potencial eléctrico entre el exterior, más positivo, que en el interior (más negativo). Esta diferencia de potencial es el factor que impulsa a los iones K^+ hacia el interior, gracias a la presencia de un uniportador más o menos específico para este ion, pero que puede mover, con menos afinidad, a otros cationes monovalentes.⁴

SISTEMA	CONSTANTE CINÉTICA	^{86}Rb	^{42}K
Alta Afinidad	K_m (μM)	150	24
	V_{max} (nmolas/min/mg)	21	34
Baja Afinidad	K_m (μM)	6	2
	V_{max} (nmolas/min/mg)	6	7

brana plasmática de la levadura se utiliza ATP como fuente de energía,³⁰ según el esquema de la figura 2.

La ATPasa de protones (H^+ -ATPasa) fue aislada y reconstituida en liposomas preparados con lectina, y el gen que la codifica fue clonado y definida su secuencia.^{41,42}

En 1984, Rodríguez Navarro y colaboradores encontraron que *S. cerevisiae* crecidas en ausencia de Na^+ y NH_4^+ , se expresan dos sistemas de transporte de K^+ diferentes (Tabla 1).

Tal descubrimiento llevó a estos autores a proponer la existencia de un sistema de transporte de K^+ interconvertible, que pudiera operar con dos afinidades diferentes; o bien, dos sistemas de transporte independientes, uno de alta y otro de baja afinidad para el ion potasio.³⁷

En 1985, el grupo de Rodríguez-Navarro obtuvo un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el transporte de po-

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



tasio de alta afinidad, lo que demostró la existencia de dos sistemas de transporte de K^+ independientes o bien, como ya se dijo, la hipótesis sobre un sistema interconvertible para el transporte de potasio con dos afinidades diferentes.³⁵ Otros estudios en sistemas procariontes y eucariontes han demostrado que el potasio se transporta por sistemas múltiples, funcionalmente independientes y que tienen diferentes afinidades por cada catión.

En 1988 el grupo de Gaber, clonó y secuenció el gen *TRK1* de *S. cerevisiae*, planteándose como el responsable del sistema de transporte de alta afinidad.¹⁰ Partiendo del hecho de que el sistema de transporte de potasio está acoplado electrogénicamente con el bombeo de protones³⁰ y de la clonación de *TRK1*, se demostró contundentemente que el transportador y la H^+ ATPasa son diferentes proteínas. De aquí se desprende la primera conclusión importante: existe una independencia física y funcional de los sistemas de transporte de potasio y el bombeo de protones.

Para 1990, el grupo de Gaber reportó la secuencia del gen *TRK 2* como el responsable del sistema de transporte de potasio de baja afinidad, pues al crear una doble mutante de los dos transportadores de potasio, la levadura sólo es capaz de crecer a partir de concentraciones de potasio de 100 mM.¹¹ Las mutantes mostraron hipersensibilidad a pH bajo que puede ser suprimida por altas concentraciones de potasio pero no de Na^+ . El gen *TRK-1* suprime los defectos en el transporte y la hipersensibilidad al pH. El gen *TRK-2* codifica, por similitud, para un transportador de potasio similar a *TRK-1* con 12 dominios transmembranales y una región hidrofóbica grande.²⁴

En 1994 Ramos y colaboradores, proponen que el *TRK2* no es un componente de baja afinidad para el transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae*. Con base en estudios cinéticos de transporte de ^{86}Rb , se analizaron las mutantes *trk1 TRK2*, *trk1 TRK2*²⁰ (sobrexpresado) y *trk1 trk2*, revelando que el *TRK 2* presenta moderada afinidad por el ^{86}Rb . Cuando se realiza un ayuno de K^+ la mutante *trk1 TRK 2*, las células muestran un componente de baja afinidad y uno de moderada afinidad con una V_{max} muy baja. Por otra parte, las células que sobrexpresan el producto del gen *TRK2* en la mutante *trk1 TRK2*²¹, incrementan la V_{max} del componente de moderada afinidad y dicho componente desaparece en la doble mutante *trk1 trk2*. En contraste, en la mutante *trk1 TRK 2* la salida de ^{86}Rb no se ve afectada por mutaciones en *TRK 2*. Congruente con los diferentes niveles de actividad del componente de moderada afinidad en la salida de ^{86}Rb , la mutante *trk1 TRK2* crece lentamente en concentraciones micromolares de potasio, mientras que las células de la mutante *trk1 TRK2*²¹ las células crecen rápidamente, y en la doble mutante *trk1 trk2* hay un crecimiento pobre. Actualmente se discute la existencia de un sistema único en el transporte de K^+ compuesto por varias proteínas.³⁶

Miranda y colaboradores en 1995, demostraron en la levadura *K. lactis*, a través de la clonación de la H^+ ATPasa, la dependencia del transporte de potasio con el

potencial de membrana, pues una mutante carente de transportador de potasio cuenta con una actividad de ATPasa igual que la cepa silvestre; mientras que una mutante de la H^+ ATPasa presenta una deficiencia en el transporte de potasio.²⁷

Las secuencias de las H^+ ATPasas. El primer gen de H^+ ATPasas de hongos reportado fue el de *S. cerevisiae* denominado como *PMA 1*; de este gen se encontró otra copia en esta levadura (*PMA 2*).⁴⁰ Posteriormente se determinó la secuencia del gen homólogo de *Neurospora crassa*,¹⁶ que mostró alto grado de similitud con las secuencias de los genes *PMA1* y *PMA2* *S. cerevisiae*. Utilizando como sonda la ATPasa de *S. cerevisiae*, se identificaron otras ATPasas por hibridaciones con bibliotecas genómicas de *Schizosaccharomyces pombe*,¹³ *Zygomycetes roxii*⁴⁷ y *Candida albicans*.²⁹

Las secuencias de los TRK's. En 1988 se clonó y se secuenció el gen que codifica para el acarreador de alta afinidad *TRK-1* en *S. cerevisiae*, demostrando la independencia física y funcional del sistema de transporte de potasio y de protones.¹⁰ Posteriormente por hibridación, utilizando como sonda el gen *TRK-1* de *S. cerevisiae* se identificaron secuencias con similitudes en el genoma de la mayoría de las especies de *Saccharomyces* y se clonó el gen *TRK-1* de *Saccharomyces uvarum*¹ y *S. pombe*,⁴⁴ encontrándose que confiere un transporte de alta afinidad al igual que el de *S. cerevisiae*. Ambos genes tienen secuencias con 86 % de similitud con *TRK 1* de *S. cerevisiae*.¹¹ En nuestro grupo de trabajo estamos caracterizando el gen homólogo *TRK1* en la levadura *K. lactis*, el cuál presenta una identidad alta con respecto a los ya clonados y secuenciados Fig. 3.

En 1991, Haro y colaboradores señalaron que el *TRK-1*, puede ser un componente regulador del sistema del transporte de potasio de *S. cerevisiae* y que se requiere para potenciar el influjo de potasio por la disminución del pH interno.¹⁹

El descubrimiento de que el *TRK-1* y *TRK-2* codifican para transportadores de potasio estructuralmente homólogos, así como son los dos genes *PMA-1* y *PMA-2* que codifican para bombas de protones en *S. cerevisiae*,⁴¹ haría pensar que el *TRK-2* pudiera ser un regulador de transporte.³⁶

S. cerevisiae con eliminación de los genes *TRK1* y *TRK2* requiere de 100 mM de potasio para poder crecer, lo cual ha sugerido la probable existencia de otro u otros transportadores. Se han identificado mutaciones supresoras (designadas *RPD*) en *Δtrk1 Δtrk2*, restableciéndose el sistema de transporte de potasio. Dichas mutaciones supresoras se seleccionaron por la capacidad de permitir el crecimiento en baja concentración de potasio (7 mM, pH 5.9); y por supresión del fenotipo a pH bajo y alta concentración de potasio (pH 3.0, 100 mM). La selección directa por supresión del defecto en el transporte de potasio ha dado la pauta para obtener nueva información a cerca de la función de otras proteínas en el transporte de potasio en la levadura.



Figura 3. Homología entre las proteínas transportadoras de potasio TRK de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sctrk1 y 2); *Saccharomyces uvarum* (Sutrkl); *Schizosaccharomyces pombe* (Sptrk1) y *Kluyveromyces lactis* (Kltrkl).

	Sctrk1	Sctrk2	Sutrkl	Sptrk1	Kltrkl
Sctrk1	100	71.4	87.7	59.7	69.5
Sctrk2	55.9	100	71.6	58.3	63.0
Sutrkl	79.6	55.1	100	61.8	68.5
Sptrk1	39.4	38.4	39.4	100	54.2
Kltrkl	51.0	44.2	50.6	32.9	100
	%Similitud				
	%Identidad				

ra. La secuenciación de las mutantes supresoras han mostrado un alto porcentaje (86% de identidad de aminoácidos) con proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos. Estos resultados sugieren que el transporte de potasio puede deberse a un incremento en la permeabilidad de la membrana cuando los transportadores están realizando el transporte de glucosa y los iones se mueven por este medio de manera inespecífica.¹²

En 1991 Peña y Ramírez, demostraron que en mutantes de levadura del sistema de alta afinidad, la adición de glucosa provoca una salida de cationes monovalentes, que se acelera notablemente por cationes trivalentes como el Tb^{3+} . Con el uso de este tipo de mutantes se ha visto que la salida de potasio espontánea requiere de sustratos como glucosa o etanol. Estos resultados demuestran que la salida de potasio se realiza por proteínas diferentes a las codificadas por los genes *TRK1* y *TRK2*.³¹

En nuestro grupo de trabajo, hemos caracterizado el transporte de potasio en *K. lactis* demostrándose cinéticamente; mediante el uso del isótopo ^{86}Rb , la existencia de sólo un sistema de transporte de potasio, similar al de alta afinidad de *S. cerevisiae* (Datos no publicados).

Por otra parte, por hibridaciones heterólogas hemos clonado y secuenciado el gen responsable de dicho transporte; el gen homólogo *KITRK1*, que de igual manera tiene una alta similitud e identidad con los otros 'TRK's'. La construcción de una mutante inactivadora del gen, muestra un fenotipo donde no hay transporte de potasio; mientras que en cajas de cultivo para medios de selección requiere de un mínimo de 5 mM de K^+ para crecer. Por otra parte, la actividad de la H^+ -ATPasa de la cepa mutante $\Delta Kltrkl$ no muestra diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre, por lo cual se ha podido concluir que el fenotipo

de la mutante es defecto en el transportador de potasio y no un defecto en la actividad de la H^+ -ATPasa (Datos no publicados).

De estos resultados sugieren aparentemente que se trata de un sólo sistema de transporte, ya que un análisis de las constantes cinéticas revelan que para la expresión del sistema de alta y baja afinidad, los valores son prácticamente los mismos en la cepa silvestre. Por su parte, en la cepa interrumpida presenta una pérdida de afinidad y una consecuente disminución en la velocidad máxima de transporte.

Canales de K^+ y el caso de la levadura. Los canales de potasio son proteínas ubicuas en los organismos vivos, que se encuentran en bacterias, levaduras, plantas y animales y exhiben una gran heterogeneidad estructural. Estos canales contribuyen al control de flujo de K^+ y del volumen celular, participan en la liberación de hormonas y transmisores, al restablecimiento del potencial de membrana, así como a la excitabilidad de músculos y neuronas.²⁰

Los canales de potasio pueden ser regulados por cambios en el potencial de membrana o por el estado metabólico de la célula, o bien por hormonas y transmisores.²⁰

Últimamente se clasifican los canales de potasio con base motivos estructurales conservados que puedan estar involucrados en la actividad del canal. Este tipo de clasificaciones se lleva a cabo debido a que las propiedades de selectividad de cada canal, se pueden modificarse por mutaciones que cambian la selectividad iónica.²⁰

La clonación y secuenciación de canales de potasio han revelado la existencia de una familia de canales de potasio dependientes de voltaje (*voltage-gate K^+ channel*) y la familia de los canales rectificadores de entrada de potasio (*Inward Rectifier K^+ channel*). Los canales de potasio dependientes de voltaje y los canales de potasio activados por calcio, contienen seis probables segmentos transmembranales (S1-S6) cada uno en subunidades α , o también conocidas como dominios de selectividad iónica. Las subunidades β de los canales voltajes dependientes, tienen motivos potenciales para la unión de nucleótidos, por ejemplo NAD (P)H. Los canales de potasio rectificadores entrantes aparecen relacionados distantemente de los canales de potasio voltaje dependiente y presentan sólo dos probables segmentos transmembranales (M1, M2) en α subunidades cada uno. Las subunidades β de canales rectificadores entrantes de potasio y los canales de potasio ATP-sensibles, contienen múltiples segmentos transmembranales probables y dos dominios de unión de nucleótidos que los relaciona con la superfamilia de los transportadores ABC, que tienen una región específica para unir ATP.²¹

Las proteínas codificadas por genes *TRK1* y *TRK2*, contienen múltiples regiones hidrófobas con semejanza a los transportadores ABC. La remoción de estas proteínas elimina la corriente rectificadora entrante de potasio. Si bien, no se conoce algún gen que codifique para un canal de rectificación entrante de potasio en *S. cerevisiae*, este hecho ha servido para clonar genes de este tipo por complementación de la mutante ya mencionada.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Ya se ha hablado de que los canales iónicos son proteínas, o bien complejos de proteínas en la membrana y que media el transporte pasivo de iones a través de la formación de un poro acuoso de difusión. Actualmente se manejan dos características principales para los canales: la primera es que los iones se mueven a través de ellos extremadamente rápido ($\sim 10^6$ iones/seg); y la segunda que la apertura y cierre de los canales está regulada por cambios en el potencial de membrana debido a unión de ligandos específicos, o bien por cambios en la fluidez de la membrana plasmática.²⁵

La caracterización de la salida de iones en la levadura se ha realizado y registrado de diferentes maneras. Pero no fue sino hasta 1995 que se reportó un gen responsable de la salida de K^+ que codifica para una proteína de tipo canal. Se describió como una nueva familia de canales de potasio rectificador saliente (TOK1) cuya característica principal es que presenta dos regiones de poro en tándem.²² Ese mismo año, Xin-Liang Zhou y colaboradores, describieron a este mismo gen como el codificador responsable de un canal de potasio de membrana plasmática de levadura, activado por depolarización. El gen fue nombrado por éste grupo como *YKC1*.⁴⁸

El canal rectificador saliente de potasio en la membrana plasmática de la levadura es el encargado de la salida de K^+ . Otros estudios han demostrado que también es activado por altas concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático y que la función de ésta proteína, muy probablemente sea mantener el balance de carga durante el desplazamiento de protón acoplado al transporte de sustratos.^{6,17}

Gustin y colaboradores en 1988, mostraron que en la membrana plasmática de la levadura existe actividad de un canal que tiene conductancias para aniones y cationes. Este canal se caracterizó como mecanosensible y juega un papel en la osmoregulación, permitiendo la salida de iones en condiciones de estrés osmótico.¹⁸

La secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* reveló que en el brazo izquierdo del cromosoma X hay dos nuevos marcos de lectura abiertos; uno de ellos, el J0911, al ser removido en la levadura no afectó la viabilidad de las células y no se apreciaron otros efectos sobre los fenotipos bajo las condiciones registradas.²⁶

El canal TOK1 presenta una estructura topológica característica de los canales de K^+ voltaje dependiente. La traducción de este marco de lectura reveló una proteína hipotética con dos dominios de poro (*P-like domain*), cada uno constituido por un octapéptido (P1: SLLTVGLG; P2: CLLTIGYG). El análisis de hidropatía demuestra ocho hélices potencialmente transmembranales (S1-S8), con regiones de poro entre S5 y S6 y una región adicional de poro entre S7 y S8. Existe una aparente homología en las secuencias de los segmentos hidrofóbicos contiguos a cada región de poro y el dominio S6 es similar al de los canales de potasio.²²

Con base al uso de codones para este gen (*low condom hia index CBI ~0.055*), se sugiere que se expresa en bajos

niveles. Es posible por tanto, que el número de canales en la membrana plasmática por célula sea relativamente bajo y se estima este intervalo entre 10 a 40-50 copias.^{7,17}

Actualmente, se considera necesario realizar más experimentos para determinar el papel del canal rectificador saliente en la membrana plasmática de la levadura, pues sólo se ha especulado sobre la probable función, y no existe hasta el momento una explicación contundente que responda a la presencia del canal que medie la salida de K^+ .²

Hasta hace poco se pensaba que un canal, con las características antes mencionadas, era exclusivo de células y de tejidos excitables, pero el hecho de encontrarlos en la levadura ha sido un descubrimiento que no deja de sorprender, pues ¿cuál es su función específica en la levadura? Aunque se ha especulado que los canales rectificadores salientes que presentan dos regiones de poro en tándem encontrados en células animales son los responsables de la salida del potasio, y que es precisamente esta característica de doble poro la que hace que tenga una direccionalidad funcional, no se conoce todavía su papel fundamental. Sin embargo nosotros consideramos que es prematuro concluir que todos los canales con este tipo de comportamiento y con esas características estructurales produzcan un fenotipo de rectificación saliente.

Intercambio H^+/K^+ . En la levadura, el transporte de potasio hacia el interior celular, es un proceso que está controlado por dos factores primarios: la diferencia de potencial y el gradiente de pH generado por la H^+ -ATPasa.

En vesículas de membrana plasmática de levadura y fostatidilcolina, la adición de ATP conduce a la acumulación de protones dentro de ellas. Aunado a esto, se produce la entrada de ^{86}Rb aparentemente a favor de la diferencia del potencial electroquímico. De esta manera se ha propuesto la existencia de un sistema de intercambio H^+/K^+ .³³

El papel de este intercambiador en la levadura, muy probablemente esté involucrado en la regulación del pH interno de la célula. Es conocido que los iones K^+ producen indirectamente, un incremento en el bombeo de H^+ , produciendo entonces un incremento del pH interno de la célula. Ahora bien, este sistema de intercambio H^+/K^+ se sugiere como un mecanismo de seguridad en caso de una excesiva alcalinización del interior celular.³³

El gen *KHA1* corresponde a un marco de lectura (YJL094c) que codifica para un probable intercambiador K^+/H^+ en *S. cerevisiae*. La interrupción de este gen por recombinación homóloga, presenta un incremento de la concentración de potasio en el interior celular. Cinéticas de transporte de ^{86}Rb mostraron el mismo sistema de saturación para la silvestre y la mutante interrumpida. Las células mutantes acidifican más el medio extracelular y presentan una alcalinización del medio intracelular mayor con respecto a las células silvestres. Estudios de citometría de flujo han mostrado un incremento en la duplicación del DNA de las células mutantes con respecto a las silvestres.³⁴ Células mutantes de *Kha1* producen una gran acidificación consistente con una alcalinización del medio intra-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



celular aunado a una alta velocidad de consumo de oxígeno. Se especula que la alta acumulación de potasio y el incremento de la presión osmótica aceleren el ciclo celular y la actividad metabólica.

de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México 400346-5-3282PN del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México

CLONACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN

Uno de los métodos más eficientes para clonar genes relacionados con el movimiento de potasio a través de la membrana plasmática ha sido la clonación por complementación de mutantes de levadura. Esta sección no pretende describir protocolos detallados de cómo se han llevado a cabo la clonación de algunos genes, pero consideramos que es relevante mencionarlos ya que la levadura ha demostrado ser un buen modelo para describir y caracterizar nuevos elementos genéticos de organismos eucarionte y procariontes relacionados con la homeostasis de dicho catión.

En 1992 Anderson y col. reportaron el primer canal iónico (*KAT1*) plantas aislándolo de un banco de cDNA, de *Arabidopsis thaliana*, que suprimía totalmente el defecto de transporte de potasio de la doble mutante $\Delta trk1 \Delta trk 2$ de *S. Cerevisiae*.²

En 1992, Hervé Sentenac y col., clonaron y expresaron en levadura de un sistema de transporte de potasio de *A. thaliana*; la complementación se realizó en la mutante de *S. cerevisiae* $\Delta trk1$ clonándose el gen *AKT1*.³⁹

Uozumi y colaboradores en 1995 realizaron mutagénesis al azar en el motivo estructural GYG del gen *KAT1* que corresponde a la región de poro y que al ser modificado provoca cambios en la selectividad por potasio.⁴⁶

Se ha clonado un canal (*ORK1*) de escape selectivo para potasio de *Drosophila melanogaster* por expresión en *S. cerevisiae* en la cepa $\Delta trk1 \Delta trk 2$, en la cual confiere capacidad para transportar potasio cuando es expresado heterológamente.¹⁵

También se han podido clonar genes que codifican para proteínas de tipo canal de organismos más complejos como son los vertebrados. Tal es el caso del grupo de Tang que en 1995 clonaron por expresión funcional un canal Rectificado entrante de K^+ (*gPIRK1*) en levadura, utilizando la cepa $\Delta trk1 \Delta trk 2$ como receptora.⁴⁵

Se ha clonado el gen *HAK1* de la levadura *Schwanniomyces occidentalis*, que confiere la capacidad para crecer en medios bajos en K^+ de *S. cerevisiae* $\Delta trk1$ y $\Delta trk1 \Delta trk2$.⁵

Périer y colaboradores en 1995 clonaron y secuenciaron una probable ATPasa de la familia Clp/HSP104 (*SKD3*). Este suceso constituye el punto de partida para la clonación de nuevos miembros de las familias de ATPasas.³²

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos: IN207696

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. A., L. A. Best y R. F. Gaber 1991 Structural and functional conservation between the high-affinity K^+ transporters of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 99:39-46.
- Anderson, J. A., S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas y R. F. Gaber 1992 Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3736-40.
- André, B. 1995. An overview of membrane transport protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1575-1611.
- Armstrong, A. y A. Rothstein. 1964 Discrimination between alkali metal cations by yeast. *J. Gen. Physiol.* 48:61-71.
- Bañuelos, M. A., R. D. Klein, J. Alexander-Bowman y A. Rodríguez-Navarro 1995 A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the *Kup* system of *Escherichia coli* has a high concentration capacity. *EMBO J* 14:3021-3027.
- Bertl, A., C. L. Slayman y D. Gradmann. 1993 Gating and conductance in an outward-rectifying K^+ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132:183-199.
- Bertl, A., J. A. Anderson, C. L. Slayman y R. F. Gaber. 1995 Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of *Kat1*, an inward-rectifying K^+ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channel and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:2701-2705.
- Clayton, R., O. White, K. A. Ketchum y J. C. Venter. 1997 The first genome from the third domain of life. *Nature*. 387:459-462.
- Conway, E. J. y O. Malley E. 1946. The nature of the cation exchange during yeast fermentation with formation of 0.02 N H-ion. *Biochem J.* 40:59.
- Gaber, R. F., C. A. Styles y G. R. Fink. 1988. *Trk1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 8:2848-2859.
- Gaber, R. F., M. C. Kielland-Brandt y G. R. Fink. 1990 *Holl* mutations confer novel ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10:643-652.
- Gaber, R. F. 1992. Molecular genetics of yeast ion transport. *Int. Rev. Cytol.* 137:299-353.
- Ghislain, M., A. Sclesser y A. Goffeau. 1987 Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



- sensity of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Schizosaccharomyces pombe* J Biol Chem 262:17549-17555.
- 14 Goffeau, A. y C W Slayman 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim Biophys Acta 639:197-223.
 - 15 Goldstein, S. A. N., L. A. Price, D. N. Rosenthal y M. H. Pausch. 1996 *ORK1*, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad. Sci. USA. 93:13256-13261.
 - 16 Goormaghtigh, E., C. Chadwick y G. A. Scarborough. 1986. Monomers of the *Neurospora* plasma membrane H^+ -ATPase catalyze efficient proton translocation. J. Biol. Chem. 261:7466-7471.
 - 17 Gustin, M. C., B. Martinac, Y. Saimi, M. R. Culbertson y C. Kung 1986. Ion channels in yeast. Science 233:1195-1197.
 - 18 Gustin, M. C., X. L. Zhou, B. Martinac y C. Kung 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. Science 242:762-765.
 - 19 Haro, R., B. Garciadeblas y A. Rodríguez-Navarro. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. FEBS-Lett 291:189-91.
 - 20 Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. (Sinauer Sunderland, MA).
 - 21 Jan, L. Y. y Y. N. Jan 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. Annu Rev Neurosci. 20:91-123.
 - 22 Ketchum, K., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek y S. A. N. Goldstein. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. Nature 376:690-695.
 - 23 Kreger-van Rij, N. J. W. 1986. The yeast: A taxonomic study. Elsevier Science Publishers. New York. N. Y. 517 pp.
 - 24 Ko, C. H., A. Buckley y R. F. Gaber. 1990. *TRK2* is required for low affinity K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 125:305-312.
 - 25 Latorre, R. 1996. Biofísica y fisiología celular. Universidad de Sevilla.
 - 26 Miosga, T., A. Witzel y F. K. Zimmermann. 1994. Sequence and function analysis of a 9.46 Kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. Yeast 10:965-973.
 - 27 Miranda, M., J. Ramirez, A. Peña y R. Coria. 1995. Molecular cloning of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K^+ uptake. J. Bacteriol 177:2360-2367.
 - 28 Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191:144.
 - 29 Monk, B. C. y D. S. Perlin 1984. Fungal plasma membrane proton pumps as promising in baker's yeast. J Cell Microbiol. 20:209-223.
 - 30 Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou y M. Tuena. 1972. Effect of the pH on the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Biochem Biophys 153:413-425.
 - 31 Peña, A. y J. Ramirez. 1991. An energy-dependent efflux system for ions in yeast. Biochim Biophys Acta 1068:237-244.
 - 32 Périer, F., C. M. Radeke, F. Raab-Graham y C. A. Vandenberg. 1995. Expression of a putative ATPase suppresses the growth defect of a yeast potassium transport mutant: identification of a mammalian member of the Clp/HSP104 family. Gene 152:157-163.
 - 33 Ramirez, J., A. Peña y M. Montero-Lomeli. 1996. H^+ / K^+ exchanger in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. Biochim. Biophys Acta 1285:175-182.
 - 34 Ramirez, J., O. Ramirez, C. Saldaña, R. Coria y A. Peña. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+ / H^+ exchanger. J. Bacteriol 180:5860-5865.
 - 35 Ramos, J., P. Contreras y A. Rodríguez-Navarro. 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol. 143:88-93.
 - 36 Rodríguez-Navarro, A. y J. Ramos. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159: 940-945.
 - 37 Ramos, J., R. Alijo, R. Haro y A. Rodríguez-Navarro. 1994. *TRK2* is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176:249-252.
 - 38 Rothstein, A. y L. H. Enns. 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. J. Cell. Comp. Physiol 28:231-252.
 - 39 Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, L. Lacroute, J.-M. Salmon, F. Gaymard y C. Grignon. 1992. Cloning and expression in yeast of plant potassium ion transport system. Science 256:223-225.
 - 40 Serrano, R. 1985. Plasma membrane ATPase of plant and fungi. CRC. Press USA. 179 p.
 - 41 Serrano, R. Kielland-Brand. 1986. PMA1, the gene for yeast plasma membrane ATPase. 13th Int. Conf. on yeast genetics and molecular biology.
 - 42 Serrano, R. Kielland-Brand y G. F. Fink. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+ - K^+) K^+ and Ca^{2+} -ATPase. Nature. 319:689-693.
 - 43 Schlessner, A., S. Ulaszowski, M. Ghislain y A. Goffeau. 1988. A second ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol. Chem. 263:19480-19487.
 - 44 Soldatenkov, V., J. A. Velasco, A. M. Avila, A. Dritschilo y V. Notario. 1995. Isolation and characterization of *SpTRK*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K^+ transporter protein. Gene 161:97-101.
 - 45 Tang, W., A. Ruknudin, W.-P. Yang, S.-Y. Shaw, A. Knickerbocker y S. Kurtz. 1995. Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K^+ channel in yeast. Mol. Biol. Cell. 6: 1231-1240.
 - 46 Uozumi, N., W. Gassmann, Y. Cao y J. Schroeder



- 1995 Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inwardly rectifying potassium channel by mutant selection in yeast J. Biol. Chem. 270:24276-24281
- 47 Watanabe, Y., S. Tamai, T. Nishi y T. Yagi 1995 Efflux of sodium ions by a Na⁺/H⁺ antiporter during salt stresses in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* J. Gen. Appl. Microbiol. 41:87-97
- 48 Zhou, X-L., B. Vaillant, S. H. Loukin, C. Kung y Y. Saimi. 1995 *YKC1* encodes the polarization-activated K⁺ channel in the plasma membrane of the yeast FEBS-Letters 373:170

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la revisión anterior no se aborda con suficiente profundidad el tema de los canales de potasio. Por esta razón consideramos que es importante ahondar en los aspectos básicos para entender con mayor claridad los resultados presentados en este trabajo de tesis. A continuación se profundiza en algunos aspectos de los canales de potasio con la intención de introducir, posteriormente, las incógnitas prevaecientes en el tema.

¿Qué es un canal iónico?

Los canales iónicos son complejos de proteínas de membrana plasmática y su función radica en facilitar la difusión de iones a través de las membranas biológicas. Las membranas construyen una barrera dieléctrica (hidrofóbica-hidrofílica) para las moléculas cargadas. Los canales iónicos proveen una ruta hidrofílica de alta conductividad a través del interior hidrofóbico de una membrana. Se sabe que el poro de un canal cataliza el transporte de las moléculas cargadas a través de un medio con una constante dieléctrica baja. El sitio catalítico de un canal puede estar abierto o cerrado. La conformación de canal abierto se puede comparar como un estado de transición en el que los iones están fuertemente asociados al sitio catalítico. Los cambios de transición entre el estado abierto y el cerrado se le conoce como *gating* [Hille, 1978]. Una propiedad importante de los canales iónicos es la capacidad de discernir entre los diversos iones que se encuentran en solución. Esto se debe principalmente a que en el sitio catalítico o poro existe un filtro de selectividad que permite el paso de sólo cierto tipo de iones. Con base a esta selectividad los canales iónicos se pueden clasificar como canales de potasio, calcio, sodio y cloro [Hille, 1978].

El presente trabajo se realizó con canales de potasio y por tal razón describiremos a continuación algunas de sus características estructurales y funcionales más relevantes. Comenzaremos con las bases para su clasificación y posteriormente abordaremos algunos aspectos biofísicos que los caracterizan, revisando algunos conceptos necesarios para entender su comportamiento.

Canales de Potasio

Los canales de potasio son proteínas ubicuas que se encuentran en animales, plantas, levaduras y bacterias y que se caracterizan por una gran heterogeneidad. Estos canales contribuyen al flujo de potasio, la regulación del volumen celular, participan en la liberación de algunas hormonas y de algunos neurotransmisores, contribuyen en el restablecimiento del potencial de membrana así como a la excitabilidad de los músculos y las neuronas [Jan, 1997]. Los canales de potasio pueden estar regulados por cambios en el potencial de membrana, por el estado metabólico de la célula o por transmisores y hormonas [Hille, 1978].

A lo largo de millones de años de evolución, se han seleccionado mecanismos específicos para conducir iones de potasio a través de la membrana celular y como una consecuencia se ha determinado una estructura estable para realizar estas funciones. A continuación desarrollaremos algunas de las características estructurales y funcionales que se conocen de los canales de potasio, por mucho los más conocidos en la naturaleza.

¿Cómo se determina la dirección de la corriente en los canales de potasio?

Primero abordaremos la rectificación, es decir, los canales preferentemente pasan corrientes iónicas en una sola dirección ¿Por qué? Esto puede ser entendido por tres razones [Goldstein, 2001]:

- a) La primera se basa en una concentración desigual de iones a ambos lados de la membrana. Los flujos de corriente se mueven más fácilmente del lado en el cual la concentración es más alta hacia el lado de menor concentración, es decir a favor de su gradiente de concentración. Este tipo de rectificación se conoce como rectificación abierta (*Goldman, Hodgkin & Katz rectification*) y ha sido descrita en las corrientes nativas así como en los canales conocidos como de fuga.
- b) La segunda razón se basa en la apertura y cierre de los canales (*gating*). Los canales pueden rectificar si se abren en un intervalo de voltaje en el cual se favorecen las corrientes de entrada o de salida. Por ejemplo, algunos canales de potasio dependientes de voltaje muestran una rectificación de salida que depende del voltaje, porque sólo se abren por una despolarización que favorece el flujo de potasio hacia afuera.
- c) La tercera razón se basa en un bloqueo del canal. Es decir, algunos canales rectifican debido a que son bloqueados por voltaje. Por ejemplo, las corrientes rectificadoras de entrada presentes en los canales Kir son bloqueadas internamente por el Mg^{2+} y las poliaminas (compuestos orgánicos que contienen dos o más grupos aminos: espermidina y espermina) cuando el voltaje de la membrana es positivo con respecto al potencial de equilibrio para el potasio (EK). Este tipo de canales puede ser desbloqueado mediante pulsos hiperpolarizantes por debajo de EK.

Algunos canales de potasio se asocian en tetrámeros para realizar sus funciones de selectividad iónica y de permeación.

Comparando la estructura de los canales de sodio y de calcio con los de potasio, podemos ver que es posible proponer que los de potasio se forman por 4 subunidades. Se sabe que la co-expresión de los mRNA que codifican para diferentes canales de potasio, generan canales quiméricos. Esto indica que las diferentes subunidades se mezclan en la membrana. La demostración experimental que indica que los canales de potasio son tetrámeros fue realizada por MacKinnon, usando una mutante del canal Shaker en la cual sustituye un aspartato por una asparagina en la posición 431 (D431N). Esta mutante une muy débilmente una isoforma de la caribdotoxina. La toxina bloquea el canal silvestre cuando se encuentra en el lado externo y lo hace con una constante de disociación igual a 4 nM. La mutación hace que la constante de disociación aumente aproximadamente a 1 μ M [MacKinnon, 1991 #4]. La co-expresión de los mRNA que codifican para el canal silvestre y para canal mutado tuvo como consecuencia la expresión de varios tipos de canales Shaker con diferentes sensibilidades a la toxina. Las sensibilidades abarcaron el intervalo entre la de la mutante y la de la silvestre. Si los monómeros se mezclan al azar y los mRNA tienen la misma capacidad de expresarse, unos canales tendrán sólo

subunidades silvestres, otros tendrán sólo subunidades mutadas y otros tendrán una mezcla de ambas [MacKinnon, 1991]

Que se conoce de la estructura del poro de los canales de potasio

Los datos experimentales que dieron un indicio acerca de qué región de la molécula formaba el poro en los canales de potasio fueron obtenidos con mutaciones puntuales en la región P, usando bloqueadores específicos y haciendo quimeras entre diversos tipos de proteínas que tienen una diferente conducción de los iones. Las moléculas que permitieron identificar los límites del poro para el canal de potasio Shaker fueron la caribdotoxina (CTX) y el tetraetilamonio (TEA). La primera es uno de los componentes del veneno del escorpión *Leiurus quinquestratus var hebradeus*. La CTX bloquea el paso de los iones potasio uniéndose a la boca externa del poro. Como la boca externa del canal, que en el sitio de unión de la CTX, contiene aminoácidos cargados negativamente, éstos concentran la toxina (que está positivamente cargada) en sus cercanías. La sustitución de los aminoácidos negativos por unos neutros o positivos, disminuyó la inhibición (la K_d será más alta). Esta fue la primera evidencia, pero no era suficiente para afirmar de manera inequívoca que todo el segmento P estaba involucrado en la conducción de iones. Tampoco contestaban cuáles eran los límites del túnel que une las bocas interna y externa de los canales y mucho menos en qué sitio se da la selección de iones (Latorre). Las respuestas a estas incógnitas se encontraron usando quimeras por una parte y TEA por otra.

Hartman estudió las características de conducción de dos canales de potasio NGK2 y DRK1. El primero tiene una conductancia de 24 pS y una TEA con una K_d alta. El segundo canal tiene una conductancia menor (11 pS) y su constante de afinidad por TEA es baja. Cuando el segmento P del canal de alta conductancia se reemplazó por segmento correspondiente del canal de baja conductividad, la quimera resultante expresó un canal de alta conductancia y una TEA con una alta afinidad. Estos experimentos muestran que el segmento P forma la porción de los canales en donde se realizan los procesos de conducción y de selectividad iónica (Latorre).

El TEA es un catión orgánico capaz de bloquear los canales de potasio. En el caso del canal Shaker, este catión orgánico bloquea el canal con una alta afinidad ($K_d = 0.66$ mM) en el lado citoplasmático y débilmente en el lado externo ($K_d = 30$ mM). Es claro que la identificación en el segmento P de los aminoácidos involucrados en la unión del TEA brinda la posibilidad de definir los límites del túnel que une los dos vestíbulos. Sólo dos aminoácidos localizados en los extremos de las orquillas que forman el poro son esenciales en la unión del TEA. Cuando la treonina 441 (posición del Shaker) se sustituye por una serina, la K_d de la reacción de bloqueo en el lado interno aumenta a 7 mM. Por otra parte, si la treonina 449 (posición del canal Shaker) se muta a una tirosina, la K_d para la reacción de bloqueo del lado externo disminuye a 0.7 mM. Estos resultados delimitan la longitud del túnel en el cual se realiza la selección entre los cationes a un segmento de sólo 8 aminoácidos (Latorre).

Clasificación estructural de los canales de potasio

El conocimiento de las secuencias de diversos tipos de canales de potasio ha sacado a la luz ciertas analogías funcionales que si bien son importantes, no son suficientes para hacer una clasificación. La clasificación de los canales se debe basar en un componente genético y uno estructural. La estructura de los canales iónicos se ha deducido de los índices de hidrofobicidad y es muy aproximada, por lo que se puede modificar fácilmente cuando se determine su estructura por métodos más finos tales como la resonancia magnética nuclear o la cristalografía de rayos X. Con base a su estructura podemos clasificar los canales de potasio en las siguientes familias:

1P/6TM: los canales de potasio dependientes de voltaje (*voltage-gated potassium channels*). Presentan seis segmentos transmembranales (6TM) y un dominio de poro (1P). Este dominio está involucrado directamente en la formación del filtro de selectividad y provee de especificidad al potasio.

1P/2TM: los canales rectificadores de entrada (*inward rectifying potassium channels*) presentan una región de poro y sólo dos cruces transmembranales (2TM) por subunidad.

A partir de los estudios *in vivo* e *in vitro* se han caracterizado estas dos familias de canales y se ha obtenido información sobre otras subunidades reguladoras independientes. Así se han identificado varios subtipos de canales de potasio: Canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , Canales de K^+ sensibles a ATP, canales de K^+ acoplados a proteínas G y canales de K^+ rectificadores de entrada.

2P/4TM: Constituyen una familia de canales que se describió en 1995 y que hasta la fecha se conoce poco de ellos. El primer miembro de esta familia fue el canal TOK1 de la levadura *S. cerevisiae*. Si bien es cierto que su estructura básica es diferente al resto de los miembros de esta familia (2P/8TM), fue el primer gen clonado que codificara para un canal de potasio con dos regiones de poro en tandem. Los siguientes genes que integran esta familia mostraron una estructura básica de 2P/4TM y se pueden encontrar ampliamente distribuidos en plantas (*A. thaliana*), nematodos (*C. elegans*), moscas (*D. melanogaster*) y mamíferos (*R. norvegicus*, *M. musculus*, *H. sapiens*). Comprende canales rectificadores de entrada, rectificadores de salida y canales de fuga. A la fecha se tienen bien caracterizados 8 canales de esta familia, que se clasifican en 4 subgrupos: **1. TWIK-1 y TWIK-2** (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K^+ channels*) canales con dos dominios de poro en tandem con rectificación de entrada débil; **2. TREK-1** (*for TWIK-RELATED K^+ channel*) canales de potasio relacionados con TWIK o una rectificación de entrada débil; **3. TRAKK** (*for TWIK Related Arachidonic Acid Stimulated K^+ channels*) canales de potasio con rectificación de entrada débil estimulados por ácido araquidónico o por ácidos grasos poliinsaturados y activados por presión (*stretch*); **4. TASK-1 y TASK-2** (*TWIK Related Acid-Sensitive K^+ channels*) o canales de potasio sensibles a la acidez.

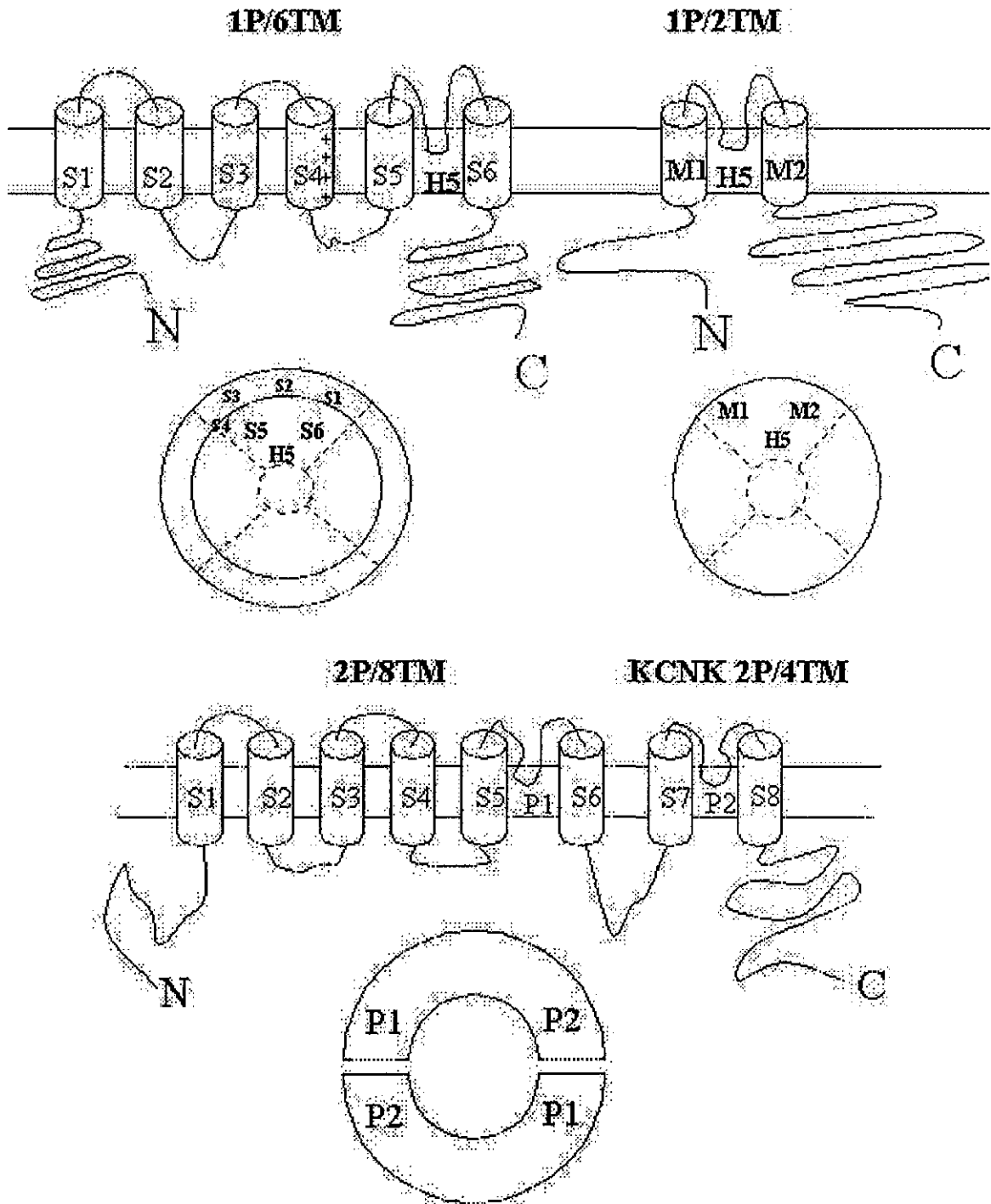


Fig1. Estructura propuesta para los canales de potasio 1P/6TM, 1P/2TM y 2P/4TM y 2P/8TM. Se sabe que las primeras dos familias acoplan en la membrana plasmática en homo o heterotetrámeros, mientras que la última se acoplan en dímeros.

A continuación se describen algunas de las características biofísicas conocidas de las familias de canales antes mencionadas.

Canales de potasio voltaje-dependientes (1P/6TM)

Esta familia de canales se caracteriza por presentar de manera intrínseca un sensor de voltaje, el cual es regulado por el potencial de membrana. Dentro de esta familia se han clasificado seis subfamilias: *Shaker* (Kv 1.1-1.7), *Shab* (Kv 2.1, 2.2), *Shaw* (Kv 3.1-3.4), *Shal* (Kv 4.1-4.3), *ether-a-go-go* (HERG) y *Slowpoke* o *slo* (Maxi K) [Jan, 1997 #1]

¿Cómo permean los iones potasio a través de los canales voltaje-dependientes?

Esta pregunta ha sido tema de muchas investigaciones en muchos laboratorios alrededor del mundo. Extensivos estudios biofísicos han revelado que los canales de potasio presentan un poro largo en el cual se pueden acomodar múltiples iones potasio en una fila. Mientras que los sitios de unión a potasio en la región del poro tienen mayor afinidad por potasio que por sodio, la presencia de múltiples iones potasio en el poro facilita su disociación de los sitios de unión debido a la repulsión electrostática entre los iones [Hille, 1978], [Neyton, 1988], [Shapiro, 1991]

Los estudios que se han hecho con el canal *Shaker* han servido para establecer los siguientes hallazgos: 1) la permeabilidad de dos diferentes iones, depende de su concentración [Perez-Cornejo, 1994], 2) la corriente en canal único (corriente de potasio vs amonio) es una función no-monotónica de la fracción molar en solución [Heginbotham, 1993], 3) el bloqueo dependiente de voltaje por cesio esta en relación de su concentración [Perez-Cornejo, 1994], 4) el bloqueo de los canales de potasio con tetraetilamonio (TEA) depende de su concentración que exista al otro lado de la membrana [Newland, 1992], 5) la proporción de entrada y de salida del potasio (utilizando una porción de flujo con un exponente de 3/4) indica que 4 iones están presentes en una fila en el poro del canal [Stampe, 1996]

Activación voltaje-dependiente de la corriente de potasio.

El sensor de voltaje detecta los cambios en el potencial de membrana e induce cambios en la estructura de la proteína, los cuales generan corrientes de compuerta (*gating currents*) que activan el canal y se dé el paso de iones [Armstrong, 1977], [Bezanilla, 1994], [Sigworth, 1994]. La secuencia del S4, que contiene residuos básicos (cargas positivas) cada tercera posición, se ha propuesto como el sensor de voltaje. El movimiento de estas cargas en la membrana promueve la apertura y el cierre del canal [Bezanilla, 1994]. Cabe señalar que este segmento cargado, también se encuentra en los canales dependientes de voltaje de sodio, de calcio [Jan, 1990].

Mecanismos de inactivación

Se han descrito dos mecanismos para explicar la inactivación de la corriente de potasio en los canales dependientes de voltaje, tomando como modelo el canal Shaker: la inactivación Tipo-N y la Tipo-C, las cuales involucran los extremos terminales amino y carboxilo respectivamente, de las subunidades α de los canales

La inactivación de Tipo-N involucra un mecanismo de bola y cadena (*ball and chain mechanism*) [Bezanilla, 1977], en el que el extremo amino de cada una de las cuatro subunidades funciona de manera independiente como una bola que ocluye el poro por el lado citoplásmico después de que el canal se ha abierto [Hoshi, 1990]; [Zagotta, 1990]; [MacKinnon, 1993]. Hoshi *et al* encontró en 1990 que la falta de algunos aminoácidos en el extremo amino del canal Shaker destruirían el proceso de inactivación. Estos experimentos permitieron circunscribir la compuerta de inactivación a los primeros veinte amino ácidos del amino terminal. En el modelo bola y cadena, estos veinte amino ácidos forman una estructura tridimensional que equivale a la bola (péptido bola o péptido inactivante). La bola inactivante “cuelga” del segmento S1 que tiene aproximadamente 70 residuos de largo. Sólo cuando el canal se abre como consecuencia de la despolarización de la membrana, la bola se puede unir a la boca interna del canal formando un tapón que impide el flujo de iones. Cuando se recorta la cadena que une la bola, la inactivación se vuelve más rápida [Hoshi, 1990].

Estudios posteriores realizados por el grupo de MacKinnon, han revelado que la inactivación tipo N se da por reacciones secuenciales donde el extremo amino, inicialmente, se une a la superficie citoplasmática del canal y posteriormente ingresa al poro como un péptido extendido [Zhou M 2001]

La inactivación Tipo-C se observa en ausencia de la inactivación Tipo-N. En el canal silvestre Shaker, éste tipo de inactivación involucra los aminoácidos del poro del canal y el segmento S6. Algunas evidencias experimentales revelan que en la inactivación Tipo-C promueve cambios estructurales en la boca externa del canal que causan un colapso localizado del poro [Liu, 1996]. Una alternativa para explicar el colapso del poro durante la inactivación Tipo-C resulta de una alteración de la selectividad del canal. Esta explicación se basa en el hecho que durante este tipo de inactivación, la permeabilidad relativa del potasio se reduce de manera significativa con respecto a la del sodio. El filtro de selectividad ahora es impermeable para el potasio, mientras que el potasio interno previene la permeación de sodio [Starkus, 1997].

La inactivación Tipo-C es rápida y pronunciada en presencia de la inactivación Tipo-N, porque el poro del canal se mantiene abierto durante la inactivación Tipo-N, pero no conduce [Baukrowitz, 1995]

Canales de potasio rectificadores entrantes (1P/2TM)

Esta familia de canales fue descrita por Katz en 1949. Katz los denominó como rectificadores anómalos porque su capacidad de rectificación era opuesta a aquella que muestra el canal de potasio involucrado en el potencial de acción. En los canales rectificadores salientes, la conductancia de la membrana aumenta cuando la célula es hiperpolarizada; esta es la anomalía (Latorre libro). En 1992 se clonó un rectificador de entrada de *Arabidopsis thaliana* denominado KAT1 que, expresado en ovocitos, sólo se activaba por potenciales más negativos que -120 mV. Por otra parte, su estructura se determinó mediante perfiles de hidrofobisidad demostrando que era muy similar al de otros canales de potasio. Este hallazgo parecía confirmar que a pesar de las diferencias funcionales, los canales de potasio parecían tener como consenso seis cruces transmembranales [Schachtman, 1992]. Poco después de describir el KAT1, se clonaron y se caracterizaron dos rectificadores de entrada clonados respectivamente en células de riñón de rata (ROMK1) y de macrófagos de ratón (IRK1; IR por *inward rectifier*). Los perfiles de hidrofobisidad de estos canales mostraron la existencia de sólo dos cruces transmembranales M1 y M2, cuya identidad con los segmentos hidrofóbicos del *Shaker* era muy baja y con una región de poro con alto grado de identidad con los canales de potasio [Ho, 1993]; [Kubo, 1993].

En cuanto a la dependencia a voltaje en esta familia de canales, la rectificación de la corriente parece ser instantánea traduciéndose en una disminución de la conductancia del canal a medida que la célula es despolarizada. De manera tal que el voltaje modifica la conductancia unitaria del canal, no la probabilidad de apertura, como es el caso de otros canales de potasio dependientes de voltaje. Cuando el voltaje de la membrana es negativo con respecto al potencial de equilibrio para el potasio (E_K), los iones potasio liberan el poro bloqueado y se da un flujo de iones significativo hacia el interior celular (Latorre libro). En cuanto a la estructura de esta familia, se ha propuesto que se agrupan en homo o heterotetrámeros y que sólo conservan el arreglo estructural interior que da origen al poro, necesario para hacer a los miembros de esta familia canales selectivos a potasio (Latorre libro).

Recapitulando, los canales que contienen en su estructura un segmento S4 cargado positivamente, los segmentos S1, S2 y S3 se especula que su función está en estabilizar la estructura del canal, aislando las cargas de S4 del interior altamente hidrofóbico de la membrana (Latorre libro).

Los canales rectificadores de entrada, meten potasio a la célula con facilidad en contra de su gradiente de concentración pero a favor de su gradiente electroquímico, manteniendo el potencial de equilibrio del potasio [Hagiwara, 1976] además de ser sensibles a la fuerza electroquímica impulsora de los iones potasio.

Considerando la débil similitud que existe entre los segmentos hidrofóbicos de los canales los rectificadores de entrada y dependientes de voltaje (S5, H5 y S6), sugiere que los múltiples dominios hidrofóbicos se encuentran involucrados en el paso del potasio. El

dominio hidrofílico C-terminal contiene residuos ácidos que está en relación con la fuerte rectificación entrante y con la permeación a potasio [Tagliatela, 1994]

Canales de potasio con dos regiones de poro en tándem (2P/4TM)

Hasta antes de 1995, los canales de potasio que se habían reportado, solo tenían un dominio de poro, caracterizado por una secuencia consenso TXGYG [donde X puede ser cualquier aminoácido], que funciona como un filtro de selectividad para el potasio [Yellen, 1991], [Heginbotham, 1994]. Con la clonación y caracterización de un canal de potasio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se generó una nueva familia, debido a que es el primer ejemplo de un canal de potasio que en su estructura primaria presenta dos regiones de poro en tándem y ocho cruces transmembranales (2P/8TM), además es el primer ejemplo de canal rectificador de salida que no depende del voltaje (*non-voltage-gated outward rectifier potassium channel*) y que es activado por una despolarización de la membrana [Ketchum, 1995].

En los años siguientes se clonaron otros genes que codifican para canales de dos poros. El gen para el canal KCNK0 (dORK1) se clonó a partir de tejido neuromuscular de *Drosophila* [Goldstein, 1996]. Su estructura teórica predice un arreglo 2P/4TM. Es el primer canal de fuga selectivo para potasio (*K⁺-selective leak conductance channel*) que se conoce. KCNK1 (TWIK1, hOHO) fue el primer gen que codifica para un canal de mamífero clonado que tiene la característica de con la característica de 2P/4TM [Lesage, 1996].

Hasta ahora se ha identificado más de 50 genes en la base de datos que tienen una estructura probable de 2P/4TM. Se han clonado 14 de ellos [Goldstein, 2001]. Con la secuenciación del genoma de *Caenorhabditis elegans*, se encontraron 42 genes que potencialmente tienen una estructura 2P/4TM. Sólo una docena de estos canales muestran una reproducibilidad experimental al expresarse en las células nativas. TOK1 [Ketchum, 1995], KCO1, el canal de *Arabidopsis thaliana* 2P/4TM [Czempinski, 1997] codifican para canales de potasio rectificadores de salida que no son dependientes de voltaje. Los canales aislados de animales KCNK0, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13 y TWK-18 codifican para canales de fuga selectivos para potasio, sin embargo, aún no es clara su función [Goldstein, 2001].

Un aspecto novedoso en esta familia de canales es que se acoplan en dímeros y no en tetrámeros como sucede con las dos familias de canales anteriormente descritas. Este hecho se basa en la estructura primaria de los canales, la cual presenta dos dominios de poro en su estructura primaria, lo que da un poro de conducción iónica con 4 dominios P.

A continuación enlistamos las características funcionales de los canales pertenecientes a esta familia que han sido más estudiados. Modificación a partir de Lesage 2000 [Lesage, 2000].

		Electrofisiología		Farmacología		
		Comportamiento	Conductancia	Bloqueadores	Activadores	Regulación
TWIK-1	336aa	Rectificador de entrada	34pS	Ba ²⁺ /quinidina		[H ⁺] _i , PKC
TWIK-2	313aa	Rectificador de entrada	ND			[H ⁺] _i , PKC
TASK-1	395aa	Rectificador GHK	14pS	Zn ²⁺ / A L	A G	[H ⁺] _e , pIC=7.3
TASK-2	499aa	Rectificador GHK	60pS	quinidina/ A L		[H ⁺] _e , pIC=8.3
TREK-1	411aa	Rectificador de salida	100pS	quinidina/Gd ³⁺ /	PUFAs/ A.G crenadores aniónicos	PKA y PKC [Na ⁺] _e , [H ⁺] _i E. de M. (P _{0.5} =-36 mmHg)
TRAAK	393aa	Rectificador GHK	45pS	Gd ³⁺	PUFAs/ A.G crenadores aniónicos	E. de M (P _{0.5} =-46 mmHg)

ND, no determinada; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados, A L. y A G, Anestésicos Locales y Anestésicos Generales; GHK Goldman-Hodgkin-Katz; [H⁺]_i ó _e, concentración interna o externa de H⁺; P_{0.5}, presión que induce la activación media máxima. Modificación a partir de Lesage 2000 [Lesage, 2000].

SECCIÓN II

RESULTADOS

Los resultados más relevantes de este trabajo de tesis se encuentran organizados en dos partes

PARTE I

The Kltrk gene encodes a low affinity transporter of the K⁺ uptake system in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*.

Aceptado para su publicación en la revista *Yeast*

PARTE II

Splitting the two-pore-domains from TOK1 result in two cationic channels with novel functional properties

Aceptado para su publicación en la revista *JBC*

RESULTADOS PARTE I

***Kluyveromyces lactis* como modelo alternativo para el estudio de los transportadores.**

El trabajo que continuación se presenta tiene como finalidad ahondar el tema de los transportadores de potasio en la levadura. Si bien es cierto que *S. cerevisiae* ha sido la levadura más estudiada para entender los sistemas de transporte de potasio, aún hay algunas incógnitas relacionadas con los mecanismos que regulan la expresión de los sistemas de transporte. Al inicio de este trabajo se planteó como objetivo clonar y caracterizar el ó los componentes involucrados en el transporte de potasio, utilizando *K. lactis* como un modelo alternativo. Esta levadura presenta características genéticas más sencillas que *S. cerevisiae*, lo cual nos permite realizar la parte medular del proyecto: la expresión heteróloga de las proteínas involucradas en la homeostasis del potasio. Este estudio nos ha llevado a demostrar que es posible la complementación de las mutantes que son deficientes en el transporte del potasio, utilizando genes ortólogos, homólogos y no homólogos de otras especies. Se demuestra así el papel funcional de estas proteínas, independientemente de la especie de levadura, e incluso, la expresión de proteínas pertenecientes a algunos organismos con un nivel de organización más complejo que la levadura.

HIPÓTESIS:

En el genoma de la levadura *Kluyveromyces lactis* se encuentran genes que codifican para proteínas homologas a los transportadores TRK1 y TRK2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos genes tendrán la capacidad de complementar de manera heteróloga ambas especies de levadura.

OBJETIVO:

Identificación, clonación y caracterización de los genes que codifican para los transportadores de potasio homólogos a TRK1 y TRK2 en la levadura *Kluyveromyces lactis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Caracterizar las clonas transformadas que se obtendrán a través de la complementación de los genes heterólogos.

Producir un sistema de expresión heterólogo que sea estable en ambas especies de levadura.

En esta primera etapa de resultados, se presentan los obtenidos al realizar el estudio de los sistemas de transporte de potasio de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Estos resultados fueron aceptados para su publicación en la revista *Yeast* bajo el título de:

The Kltrk gene encodes a low affinity transporter of the K⁺ uptake system in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*.

Manuel Miranda, Carlos Saldaña, Jorge Ramírez, Guadalupe Códiz, Aurora Brunner, Laura Ongay-Larios, Roberto Coria y Antonio Peña

- El artículo está en prensa.

The *KlTrk1* gene encodes a low affinity transporter of the K⁺ uptake system in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*.

Manuel Miranda, Carlos Saldaña, Jorge Ramírez, Guadalupe Codiz, Aurora Brunner, Laura Ongay-Larios, Roberto Coria and Antonio Peña.

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F. México. Ap. Postal 70-242.

Running Title: Potassium transport in the budding yeast *K. lactis*.

Key words: Potassium transport, *Trk1*, yeast, *K. lactis*.

Corresponding author:

Roberto Coria Ortega
Departamento de Genética Molecular,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México
04510 México, D.F. México
Ap. Postal 70-242
Tel: (525) 622 56 52
Fax: (525) 622 56 30
e-mail: rcoria@ifisiol.unam.mx

SUMMARY

Potassium uptake in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by at least two proteins known as Trk1p and Trk2p. Direct involvement on cation movements has been demonstrated for Trk1p, which is the high affinity transporter. *S. cerevisiae* cells also show low affinity potassium uptake, perhaps mediated by Trk2p. Mutants lacking Trk1p, lose high affinity system, but when grown with moderate potassium concentrations, Trk2p seems to replace it. Mutants lacking both proteins are viable but require at least 10 mM K⁺ in the medium to sustain growth. Here we report the cloning and characterization of a gene from *Kluyveromyces lactis* encoding a homologue of these two proteins. KITrkp is a 1070 amino acid peptide that show, overall, higher homology with Trk2p than with Trk1p, and its disruption gives rise to cells with deficient potassium transport and with an increased K⁺ requirement for normal growth. Determination of kinetic parameters in the *K. lactis* wild type and *Kltrk1Δ* strains, as well as in *Sctrk1Δ Sctrk2Δ S. cerevisiae* cells expressing *KITrk1*, indicated that this is a low affinity component of a major potassium uptake system in *K. lactis*. The sequence has been deposited in Genbank under accession number AF136181.

INTRODUCTION

Uptake of potassium ions through plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* takes place by means of two systems encoded by *Trk1* (Gaber *et al.*, 1988, Ko *et al.*, 1990) and *Trk2* (Ko and Gaber, 1991) genes. *Trk1p* seems to be the major potassium transporter, and *trk1* mutants lose the high affinity potassium influx, showing a requirement for higher levels of potassium than the wild type cell (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988). *Trk2p* is also involved in K^+ uptake, apparently with a lower affinity (Ko *et al.*, 1990), but the regulation of its activity seems to be complex varying with culture conditions (Ramos and Rodriguez-Navarro, 1986; Ramos *et al.*, 1994). *trk1Δ Trk2* cells regain, after derepression of *Trk2* transcription, their ability to grow on micromolar concentrations of K^+ (Vidal *et al.*, 1995). Deletion of *Trk1* and *Trk2* genes, results in 1000-fold increase in the K^+ requirement to sustain growth and cells exhibit a low affinity ectopic K^+ uptake that is not detected in wild type cells (Wright *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 1998).

Schizosaccharomyces pombe, the fission yeast, presents also a dual system for plasma membrane K^+ transport, *Trk1p* (Soldatenkov *et al.*, 1995; Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1996) and *Trk2p* (Calero *et al.*, 2000). Mutants lacking both transporters fail to grow in media with low K^+ concentration and unlike budding yeast, *S. pombe* displays biphasic transport kinetics and the presence of any of these two transporters is sufficient to sustain growth at normal potassium levels. These transporters have essentially equivalent roles for the physiology of the cell (Calero *et al.*, 2000).

A *Trk* type transporter from *Schwanniomyces occidentalis* has also been identified (Bañuelos *et al.*, 2000). This carrier seems to operate mainly at moderate K^+ concentrations, but shows variable activity, depending on the pH of the medium. Apparently, this yeast strain lacks a second *Trk* type of protein, instead, a *Hak1* carrier has been described, which mediates potassium uptake at μM concentrations and at acidic pH (Bañuelos *et al.*, 1995; Bañuelos *et al.*, 2000).

While *Trkp* homologues have been also described in *Debaryomyces hansenii* (reviewed in Rodríguez-Navarro, 2000), *Candida albicans* (Genbank Acc. No. AF267125, Miranda *et al.*, unpublished) and in the filamentous fungus *Neurospora crassa* (Haro *et al.*, 1999), *Hakp* homologues have been found in *D. hansenii* (reviewed in Rodríguez-Navarro, 2000) and in *N. crassa* (Haro *et al.*, 1999). Besides, with the increasing characterization of components of the K^+ uptake systems in fungi, many questions remain to be answered for a complete understanding of the processes, per example, what is the distribution of *Trk* type and *Hak* type of transporters among yeast species, i.e., is coexistence of both types of transporters wide spread in budding yeast? Are there *Trk1p* and *Trk2p* systems in most species? If this is so, do they have specialized or redundant functions?

Kluyveromyces lactis is heterothallic budding yeast closely related to *S. cerevisiae*, but it possesses distinctive physiological properties; per example, it is essentially aerobic and assimilates a wider variety of carbon sources, especially lactose (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). *K. lactis* lacks glucose repression of respiration, and glucose has a weak repression effect on lactose/galactose utilization (Breuning, 1989). Its life cycle resembles that of the *S. cerevisiae* and shares high similarities in haploid and diploid vegetative growth and in sexual reproduction. *K. lactis* mutants, defective in potassium uptake, have been isolated (Brunner *et al.*, 1982; Miranda *et al.*, 1995) and one of these led to clone and characterize the plasma membrane H^+ -ATPase-encoding gene. A mutation that caused low H^+ -pumping activity was used to demonstrate the direct functional relationship between the membrane potential generated by the H^+ -ATPase and the K^+ uptake system in this yeast (Miranda *et al.*, 1995).

Here we describe the cloning of a gene that codes for a K⁺ transporter of the Trk type from *K. lactis*. The putative protein shares structural characteristics with the yeast transporters known so far, but its disruption caused particular effects on the uptake properties of the cation.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and media: The *S. cerevisiae* strains used in this study were: R757 (*Mata, his4-15, lys9, ura3-52*), A159 (*Mata, his3Δ200, ura3-52, trp1Δ, trk1Δ*) and CY152 (*Mata, his3Δ200, lys9, trp1Δ, ura3-52, trk1Δ, trk2Δ::HIS3*) were gifts from R. Gaber (Northwestern University, Evanston, Illinois). *K. lactis* strains were WM37 (*Mata, his3*) and MD2/1 (*Mata, argA, lysA, uraA*). *Escherichia coli* strain DHα5 was used to propagate shuttle vectors and recombinant plasmids. Plasmids KEp6 and YEp352 (Miranda *et al.*, 1995) were used to transfect *K. lactis* and *S. cerevisiae* strains, respectively. YIp352 was derived from YEp352 by removing the 2μ replication origin and used as integrative vector for gene disruption. pCRII (Invitrogen) was used to subclone PCR products. pTZ18R (Pharmacia) was used to subclone DNA fragments for sequencing. YPD media consisted of 1% yeast extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose. SD minimal medium consisted of 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% glucose. Required amino acids and nitrogen bases were added at a final concentration of 25 μg/ml. LSK medium (Gaber *et al.*, 1988) supplemented with different K⁺ concentrations was used to determine K⁺ requirement for growth

KITrk1 Cloning: Cloning of the *KITrk1* gene was first achieved by standard PCR amplification. Degenerated oligodeoxynucleotides (27mer) designed from positions 2601(forward primer) and 3387 (backward primer) of the *ScTrk1* ORF were used to amplified a *KITrk1* ORF fragment from the *K. lactis* genomic DNA. The PCR conditions were as follow: 5 min at 94°C; 50 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C and 60 s at 72°C; and a final extension of 10 min at 72°C. The PCR product was subcloned into the pCRII vector and sequenced. The *KITrk* PCR product was used as probe to screen a KEp6-based genomic library from *K. lactis*, strain WM37. Positive clones were analyzed with restriction enzymes, subcloned into pTZ18R vector and fully sequenced in both directions.

Growth conditions: Yeast transformants were grown in SD medium supplemented with the required amino acids until mid-log phase. To test for K⁺ requirement, cells were transferred from SD medium to LSK medium containing various K⁺ concentrations. Growth was monitored after 24 or 48 hrs of incubation at 30°C.

K⁺ uptake assays and Rb⁺ transport: Yeast cells were grown until early stationary phase in YPD medium (or SD medium plus the required amino acids for cells carrying plasmids). Cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water. The final pellet was suspended in water and used as fresh cultures. For starved cells, fresh cultures were aerated for 4 h at 30°C. After aeration, the cells were collected, washed twice, and resuspended in water at a final concentration of 0.5g/ml. 100 mg of cells (wet weight) were suspended in 10 ml of 2 mM tartrate-MES-TEA pH 6.0. Glucose (50 mM) was added to energize K⁺ transport. K⁺ movements were measured by continuous recording of the extracellular medium, using a potassium selective electrode connected to an ion analyzer (Beckman Selection 2000). Rb⁺ transport was determined in whole cells as follow: 50 mg (100 μl) of cells were added to 900 μl of 2 mM MES-TEA pH 6.0, 50 mM glucose and incubated for 2.5 m at room temperature. ⁸⁶Rb was added at different concentrations and incubation continued for 2.5 m. Aliquots of 100 μl were taken out and filtered

through nitrocellulose filter (0.45 µm pore size) and washed once with 10 ml of 100mM KCl. Filters were dried and counted in a liquid scintillation counter.

Other: Standard Molecular Biology protocols (Sambrook *et al.*, 1989) and manufacturers' recommendations were followed for routine DNA manipulations. Yeast genetics procedures were as described (Sherman *et al.*, 1986).

RESULTS AND DISCUSSION

Genomic DNA from *K. lactis* (strain WM37) was used as template for PCR amplification using the oligodeoxynucleotides described in the Methods section. A PCR product of the expected size (786 bp) was obtained and cloned into the pCRII vector. Sequencing of the full fragment confirmed similarity to *Trk* genes from *S. cerevisiae*. This PCR product was then used as a probe to screen a genomic DNA library from the WM37 strain. Three positive clones were identified and one of them, of 5 Kb approximately, was analyzed with restriction enzymes and sequenced in full in both directions. The cloned gene, designated *KITrk1*, corresponded to an ORF of 3213 bp including the stop codon and codes for a putative protein of 1070 amino acid residues with an estimated molecular weight of 121.6 KDa. The sequence has been deposited in the Gene Bank under accession number AF136181. The cloned fragment carries 772 bp upstream the start codon, presumably containing the full promoter, and 1032 bp downstream the stop codon. A putative TATA box is located in position -64. The deduced primary structure of the protein strongly resembles the *S. cerevisiae* Trk1p and Trk2p K⁺ transporters. Taking into account the full primary structure of the proteins, KITrk1p shows 46% similarity and 39% identity with ScTrk1p, and 56% similarity and 48% identity with ScTrk2p.

The deduced KITrk1p presents the putative 4 MPM motifs (where M correspond to transmembrane segments and P corresponds to a loop that enters the membrane but turns out before crossing it) characteristic of K⁺ channels and transporters from a variety of organisms (Durell *et al.*, 1999; Durell and Guy, 1999) (figure 1). Comparing KITrk1p with the transporters from *S. cerevisiae* the maximum homology is found in the hydrophobic segments corresponding to the MPM domains. KITrk1p shows 81% similarity and 74% identity with ScTrk1p, and 80% similarity, 73% identity with ScTrk2p. The highest conservation between these sequences can be observed in the MPMd module (figure1A). Within this module, the transmembrane M1 segment is the most highly conserved, i.e., 21 out of 24 amino acid residues are identical in KITrk1p and ScTrk1p, and 23 out of 24 between KITrk1p and ScTrk2p. As well as the *S. cerevisiae* transporters, KITrk1p contains, in the M1d segment the W and C residues appearing to have key roles in protein interactions in the putative tetramer model proposed for this sort of transporters (Durell and Guy, 1999).

One of the main differences between ScTrk1p and ScTrk2p is the length of the hydrophilic loop linking the MPMa and MPMb modules (figure 1B). In ScTrk1p this loop is 642 amino acid residues long, while ScTrk2p contains a shorter version with only 326 residues. Interestingly, KITrk1p (having 363 amino acids in length) shares this last structural characteristic with ScTrk2p. Comparing the three variable segments that connect the MPM modules and the amino and carboxyl ends of the transporters (figure 1B), KITrk1p presents 46% similarity and 38% identity with ScTrk2p while it shows 38% similarity and 32% identity with ScTrk1p. The carboxyl tail of KITrk1p, nevertheless, is at least 3-fold longer than any of the *S. cerevisiae* carriers (figure 1B). Taking the above structural characteristics into account it was concluded that KITrk1p is the structural homologue of ScTrk2p.

While potassium channels in general comprise a single core and assemble as homotetramers, most of the carriers contain a string of four cores within a single polypeptide. The characteristic signature for selectivity in potassium channels is GYG (Doyle *et al.*, 1998), while GLX or GFX is found in the P loops of the ScTrk(s) (figure 1A). It is remarkable that K1Trk1p contains identical signatures in 3 out of 4 P loops (Pa, Pb and Pd) to ScTrk1p, while it is identical in 1 out of 4 to ScTrk2p. As the ScTrks, Trk1p from *K. lactis* contains the well conserve GLS motif in the Pd loop. Whether these structural characters have a mechanistic meaning, remains to be investigated.

Disruption of *K1Trk1* gene was accomplished by homologous recombination using the integrative vector YIp352. The *K1trk1Δ* mutant required a two-fold increase in K⁺ concentration in the medium to grow at level similar to the wild type strain (figure 2A). While the wild type strain grew well in LSK medium containing as low as 10 μM K⁺, the *K1trk1Δ* mutant required at least 1 mM. Addition of at least 10 mM K⁺ in the medium eliminated the shift in the generation doubling time of the *K1trk1Δ* strain. Moreover, long incubation periods (more than 72 h) of the disrupted mutant allowed slow growth even in media containing 10 μM K⁺.

Dependency of high potassium concentration in the medium has been observed for both *trk1Δ* and *trk1Δ trk2Δ* *S. cerevisiae* strains (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990). This requirement is alleviated not only by expression of potassium transporters from different species (reviewed in Rodríguez-Navarro, 2000) but also by gene products that may encode non-K⁺ transporters that support ectopic K⁺ uptake (Liang *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 1998). This same effect is obtained by overexpression of the endogenous Tok1p potassium channel (Fairman *et al.*, 1999) or even with channels from heterologous systems (Bertl *et al.*, 1995). Rescue of the *Sctrk1Δ Sctrk2Δ* growth defect in low potassium LSK was achieved when K1Trk1p was overproduced from the multicopy plasmid YEp352 (figure 2b). In this experiment the heterologous transporter allowed growth of the *S. cerevisiae* mutant in a medium containing as low as 0.01 mM K⁺.

Disruption of the *K1Trk1* gene altered potassium uptake in *K. lactis*. As can be seen in figure 3A (left panel), addition of starved cells to the K⁺-free incubating medium resulted in a spontaneous cation efflux of the same magnitude (about 23 μM) in both the wild type and the *K1trk1Δ* mutant. A rapid reuptake of K⁺ is observed in the wild type strain upon addition of glucose but not in the disrupted strain. Additionally, glucose stimulus resulted in an important efflux of K⁺ from fresh *K1trk1Δ* cells grown in medium with 100 mM K⁺ (figure 3A, right panel). This behavior was reported before (Peña and Ramírez, 1991) in the *Sctrk1Δ* mutant grown in a complex medium, and was ascribed to an active K⁺/H⁺ exchanger.

In the same way that expression of the *K1Trk1* gene restores growth of the *S. cerevisiae* *trk1Δ trk2Δ* cells in low potassium medium, it also restores efficient uptake of the cation as shown in the K⁺ electrode recording experiment (figure 3b). In these experiments, *trk1Δ trk2Δ* starved cells carrying the *K. lactis* transgene showed an initial two-fold spontaneous efflux compared to the double mutant carrying vector alone; addition of glucose had no effect on mutant cells, but induced a total influx of the cation in the transfected cells.

The above set of experiments shows that *K1Trk1* gene encodes a protein with a role in potassium uptake in *K. lactis* and that this transporter is able to restore potassium uptake in *S. cerevisiae* cells devoid of its native transporters. In addition, since *K1trk1Δ* cells may eventually grow even

in medium with 10 μM K^+ (figure 2A), and that starved cells still show slow cation influx after addition of glucose (figure 3A), it is feasible to assume that mutants retain an active K^+ uptake system.

Determination of kinetic parameters for specific ^{86}Rb transport was done in starved wild type and *Kltrk1 Δ* cells. Affinity for Rb^+ was essentially the same in both wild type and disrupted strains (figure 4A), but *Kltrk1 Δ* cells showed one half reduction in V_{MAX} compared to that of the wild type cells. This last observation indicates that deficiency in K^+ uptake and requirement for high K^+ concentration to sustain grow, should be attributed to reduction of total number of transporters in the disrupted strain. Determination of Rb^+ transport in these conditions, also confirmed that *Kltrk1 Δ* cells still show capacity of K^+ transport, suggesting that K1Trk1p is not the only transporter, but a component of a major K^+ uptake system.

At this point, it could not be demonstrated whether the remaining K^+ influx is mediated by a second component of the K^+ uptake system, since we have not been able to identify a second transporter-encoding gene by hybridization experiments. Moreover, the recent report of the sequencing random project of the *K. lactis* genome (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000), in which approximately 2700 ORFs were identified, comprising about 50% of the total genome, did not show any sequence related to potassium transporters except for the one here described. However, it is not yet possible to discard the presence of a second *Trk* gene in the remaining portion of the *K. lactis* genome. Even more, it has been shown in several species of fungus, except for *S. cerevisiae* and perhaps for *S. pombe* (reviewed in Rodríguez-Navarro, 2000), that Hak type of potassium transporters coexist with *Trk* transporters, therefore, searching for components of the K^+ uptake system in *K. lactis* should include not only *Trk*(s) but also *Hak*(s).

Expression of *K1Trk1* gene, on the other hand, allowed *S. cerevisiae* cells lacking their *Trk* transporters (*Sctrk1 Δ Sctrk2 Δ*) to uptake Rb^+ with moderate affinity and with 10-fold increased V_{MAX} (figure 4B). Although, it has been shown that non- K^+ transporters, amino acid permeases and the inositol carrier per example (Wright *et al.*, 1997), may support low-affinity K^+ transport in *Sctrk1 Δ Sctrk2 Δ* cells, our results indicate that activity of K1Trk1p should make total contribution to the K^+ uptake in the transfected strain.

Besides the structural similarities between K1Trk1p and ScTrk2p, and in contrast to what has been observed when ScTrk2p is inactivated, disruption of K1Trk1p resulted in significant alteration of K^+ homeostasis in *K. lactis*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Gaber for *S. cerevisiae* strains and invaluable training to R.C. We acknowledge technical assistance of Mrs. Soledad Guevara and Mrs. Marisela Bolaños. Oligodeoxynucleotide synthesis and sequencing was done at the Molecular Biology Facility (IFC). Sequence analysis was done by the staff of the Computing Facility (IFC). This work was supported by grants 400346-5-29015N from CONACyT and IN207696 from PAPIIT, DGAPA, UNAM.

REFERENCES

- Bañuelos, M.A., Klein, R.D., Alexander-Bowman, S.J. and Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* **14**, 3021-3027.
- Bañuelos, M. A., Madrid, R. and Rodríguez-Navarro, A. (2000). Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Mol. Microbiol.* **37**, 671-679.
- Bertl, A., Anderson, J.A., Slayman, C.L. and Gaber, R.F. (1995). Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of Kat1, an inward-rectifying K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2701-2705.
- Breuning, K.D. (1989). Glucose repression of LAC gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 422-427.
- Brunner, A., Carrasco, N. and Peña, A. (1982). Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 30-36.
- Calero F., Gómez N., Ariño J. and Ramos J. (2000). Trk1 and Trk2 define the major K⁺ transport system in fission yeast. *J. Bacteriol.* **182**, 394-399.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998). The structure of potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Durell, S. R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E.P. and Guy, R. (1999). Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters. *Biophys. J.* **77**, 775-788.
- Durell, S.R. and Guy, R. (1999). Structural models of the KtrB, TrkH., and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys. J.* **77**, 789-807.
- Fairman, C., Zhou, X.-L. and Kung, C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 channel in the budding yeast. *J. Membrane Biol.* **168**, 149-157.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2848-2859.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F. and Rodríguez-Navarro, A. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31**, 511-520.
- Ko, C.H., Buckley, A.M. and Gaber, R.F. (1990). *TRK2* is required for low affinity transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 305-312.
- Ko, C.H. and Gaber, R.F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4266-4273.
- Liang, H., Ko, C.H., Herman, T. and Gaber, R. (1998). Trinucleotide insertions, deletions, and point mutations in glucose transporters confer K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 926-935.
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J.D., Heyer, M., Höfer, M. (1996). The *SpTRK* gene encodes a potassium-specific transport protein THKp in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membrane Biol.* **152**, 169-181.

- Madrid, R., Gómez, M.J., Ramos, J. and Rodríguez-Navarro, A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**, 14838-14844.
- Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A. and Coria, R. (1995). Molecular cloning of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K⁺ uptake. *J. Bacteriol.* **177**, 2360-2367.
- Peña, A. and Ramírez, J. (1991). An energy-dependent efflux for potassium ions in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* **1068**, 237-244.
- Ramos, J., Contreras, P. and Rodríguez-Navarro, A. (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**, 88-93.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**, 249-252.
- Ramos, J. and Rodríguez-Navarro, A. (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* **154**, 307-311.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 1-30.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Soldatenkov, V.A., Velasco, J.A., Avila, M.A., Dritschilo, A., and Notario V. (1995) Isolation and characterization of SpTRK, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. *Gene* **161**, 97-101.
- Vidal, M., Buckley, A.M., Yohn, C., Hoepfner, D.J. and Gaber, R. (1995). Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of *Trk2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 2370-2374.
- Wésolowski-Louvel, M., Breuning, K. and Fukuhara, H. (1996). *Kluyveromyces lactis*: genetics, biochemistry, and molecular biology of non-conventional yeast. Springer-Verlag K.G, Berlin, Germany.
- Wright, M.B., Ramos, J., Gómez, M.J., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G. and Gaber, R. (1997). Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 13647-13652.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. A, Alignment of amino acid sequences corresponding to MPM modules of ScTrkp(s) and K1Trk1p. M1 and M2, first and second transmembrane regions respectively. P, loop entering the plasma membrane a, b, c and d, motifs of MPM modules forming the putative tetrameric model of transporters. Numbers in parenthesis indicate amino acid residues separating aligned regions. B, Schematic representation of the primary structure of Trkp(s). The four MPM motifs are represented by black boxes. Number of amino acid residues separating MPM motifs is indicated. Total number of amino acids for each transporter is indicated in parenthesis. Schemes are drawn to scale.

FIGURE 2. Growth of yeast strains in the presence of K^+ at different concentrations. Strains were grown on SD supplemented with 100 mM K^+ and the required amino acids for 24 hrs at 30°C. One colony was then streaked on LSK medium containing required amino acids and the indicated K^+ concentration. Growth was monitored after 48 hrs of incubation at 30°C. A, *K. lactis*, wild type and *K1trk1Δ* strains. B, *S. cerevisiae*, wild type and *Sctrk1Δ Sctrk2Δ* carrying vector alone or YEpK1Trk1.

FIGURE 3. Potassium uptake was determined by continuous recording of extracellular K^+ using a selective K^+ electrode. 100 mg of cells were added to 10 ml of 2mM tartrate-MES-TEA pH 6.0 at 30°C. At the indicated time, 50 mM glucose was added and recording was continued for 5 min. Calibration was done in parallel by additions of 10 μ M KCl. A, *K. lactis* wild type and *K1trk1Δ* strains. Left panel, starved cells. Right panel, fresh cells grown in 100 μ M K^+ . B, *S. cerevisiae*, *trk1Δ trk2Δ* strain, carrying plasmid alone or YEpK1Trk1.

FIGURE 4. Determination of kinetic parameters for ^{86}Rb transport. 50 mg of cells (100 μ l) were preincubated in 900 μ l of 2mM MES-TEA pH 6.0 for 2.5 min at room temperature. Different ^{86}Rb concentrations were added and incubation continued for 2.5 min. Aliquots were taken out, poured on nitrocellulose membrane (45 μ m pore size), washed with 10 ml of 100 mM KCl, and counted in a liquid scintillation counter. The most probable lines and K_M and V_{MAX} were adjusted by non-linear regression. A, *K. lactis* wild type and *K1trk1Δ* strains. B, *S. cerevisiae*, *trk1Δ trk2Δ* strain, carrying plasmid alone or YEpK1Trk1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

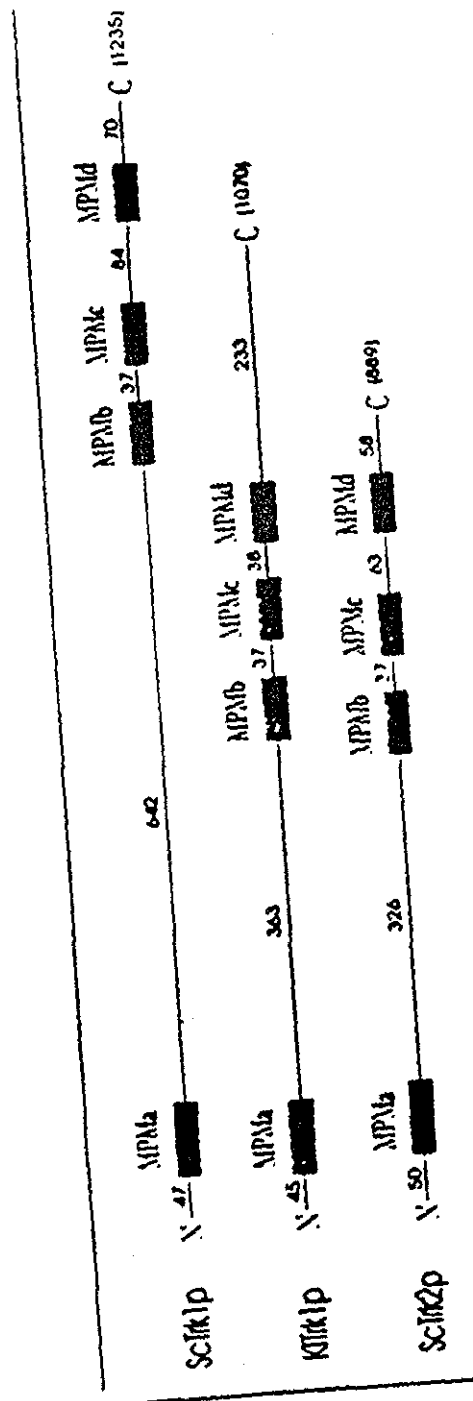


Fig B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

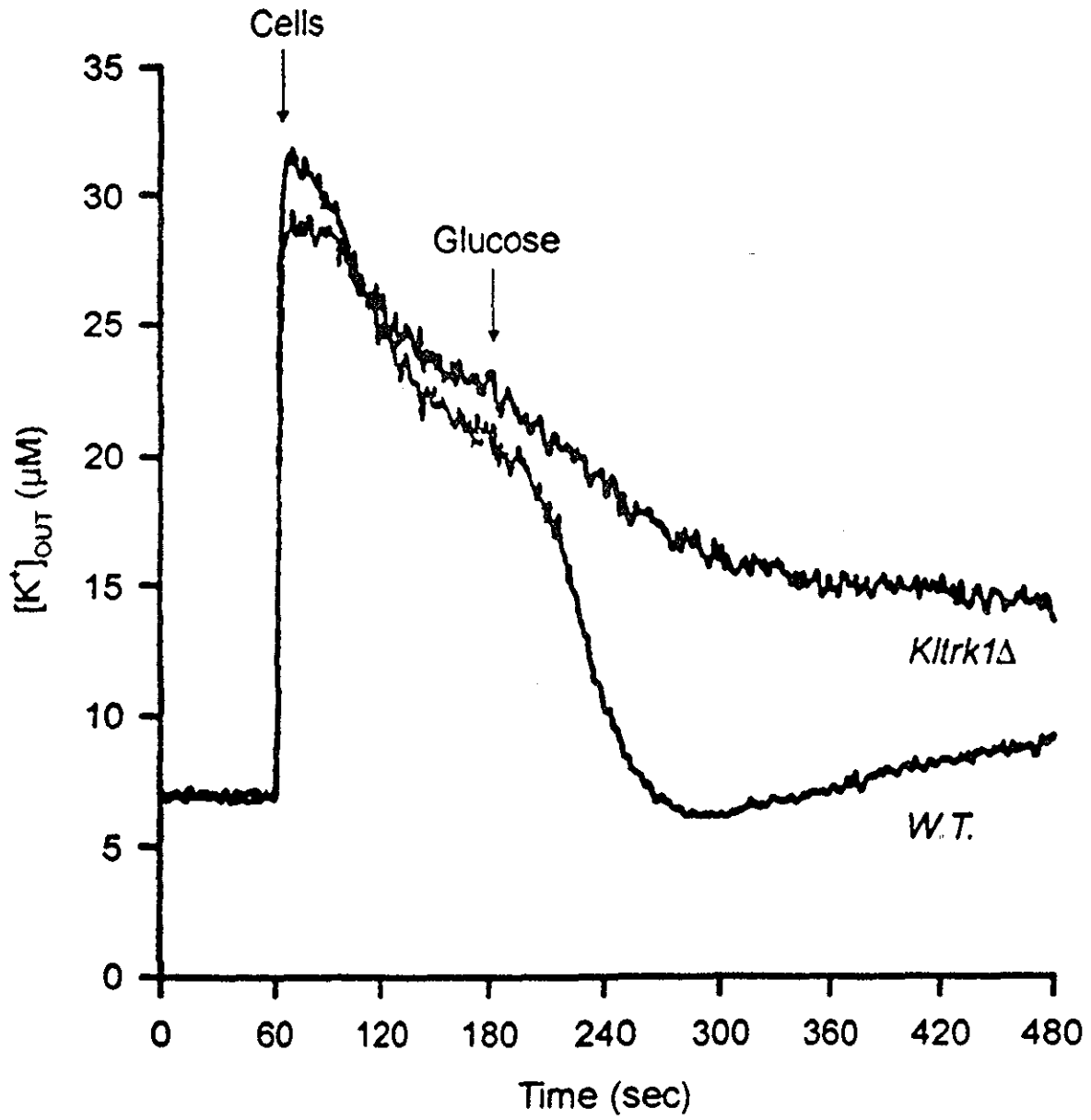


Fig 3A (left)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

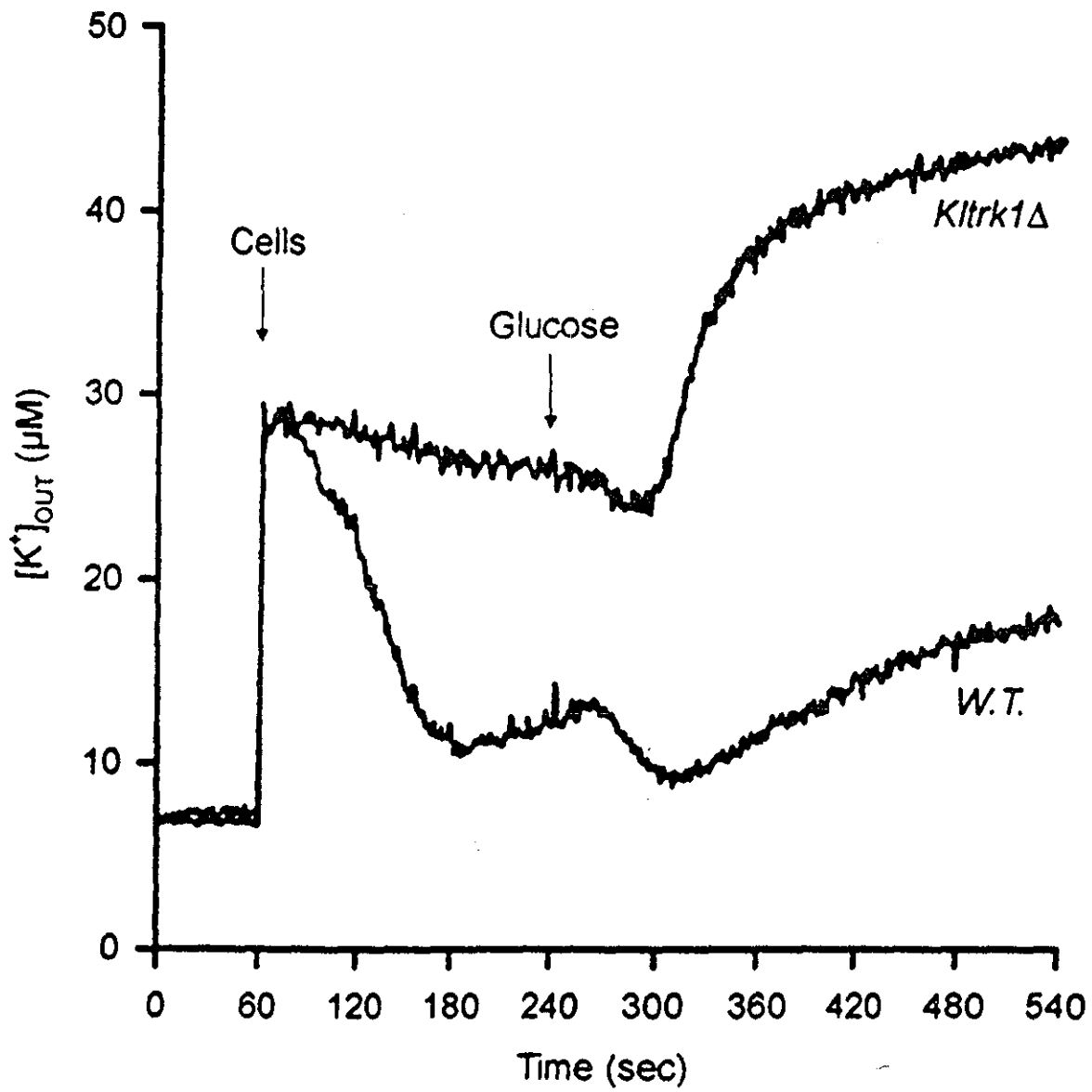


Fig 3A (Right)

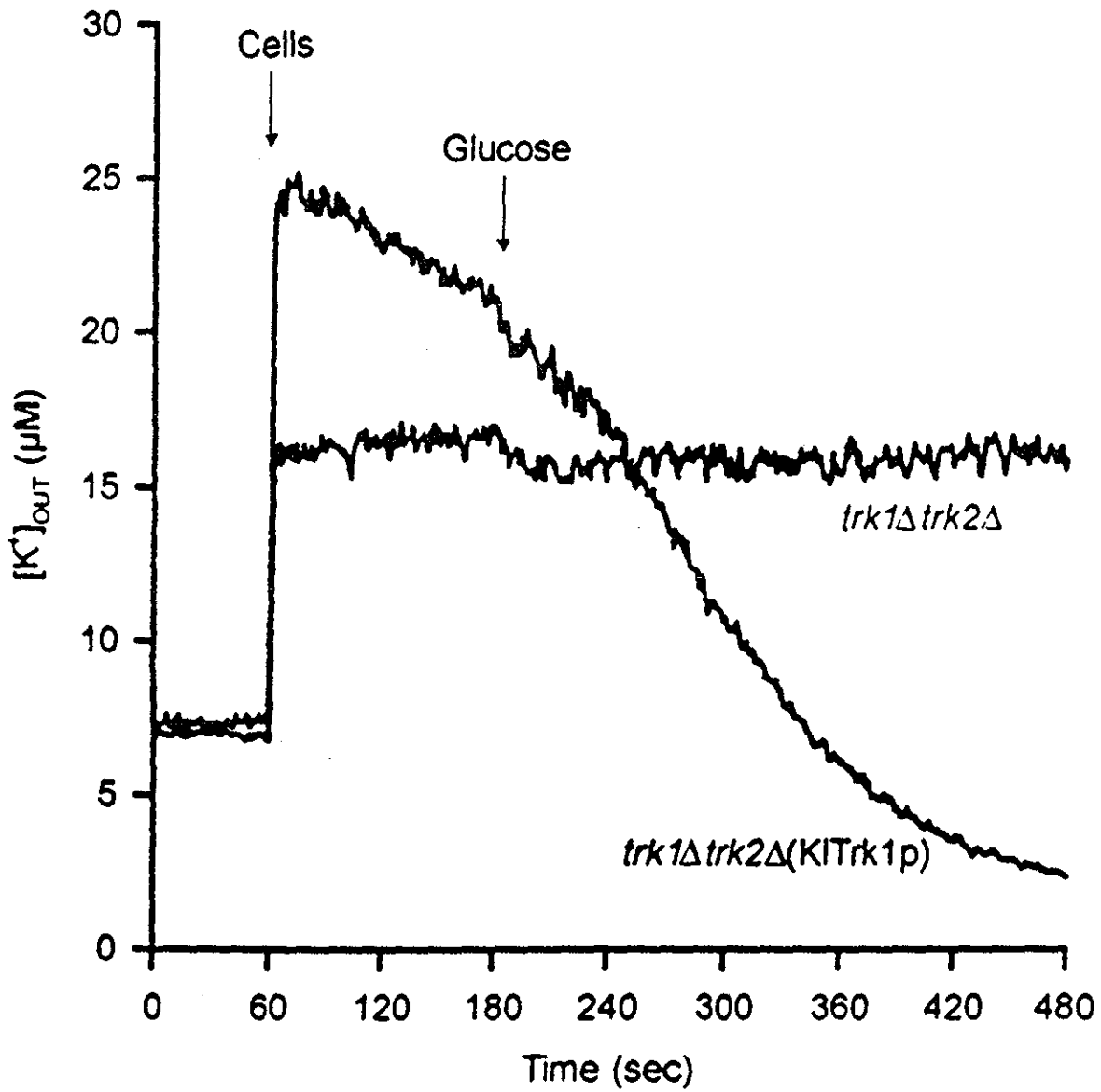


Fig 3B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

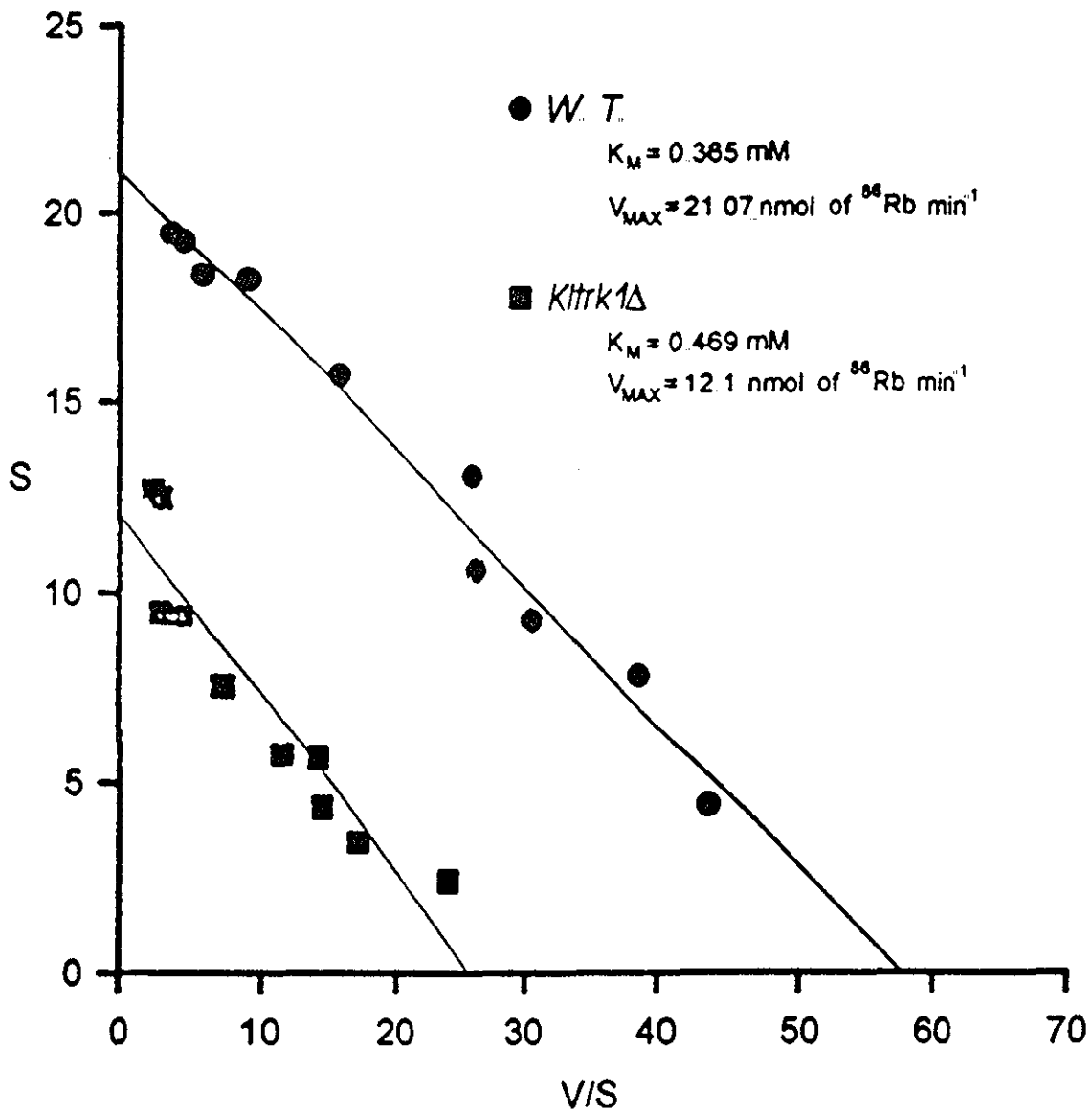


Fig 4A

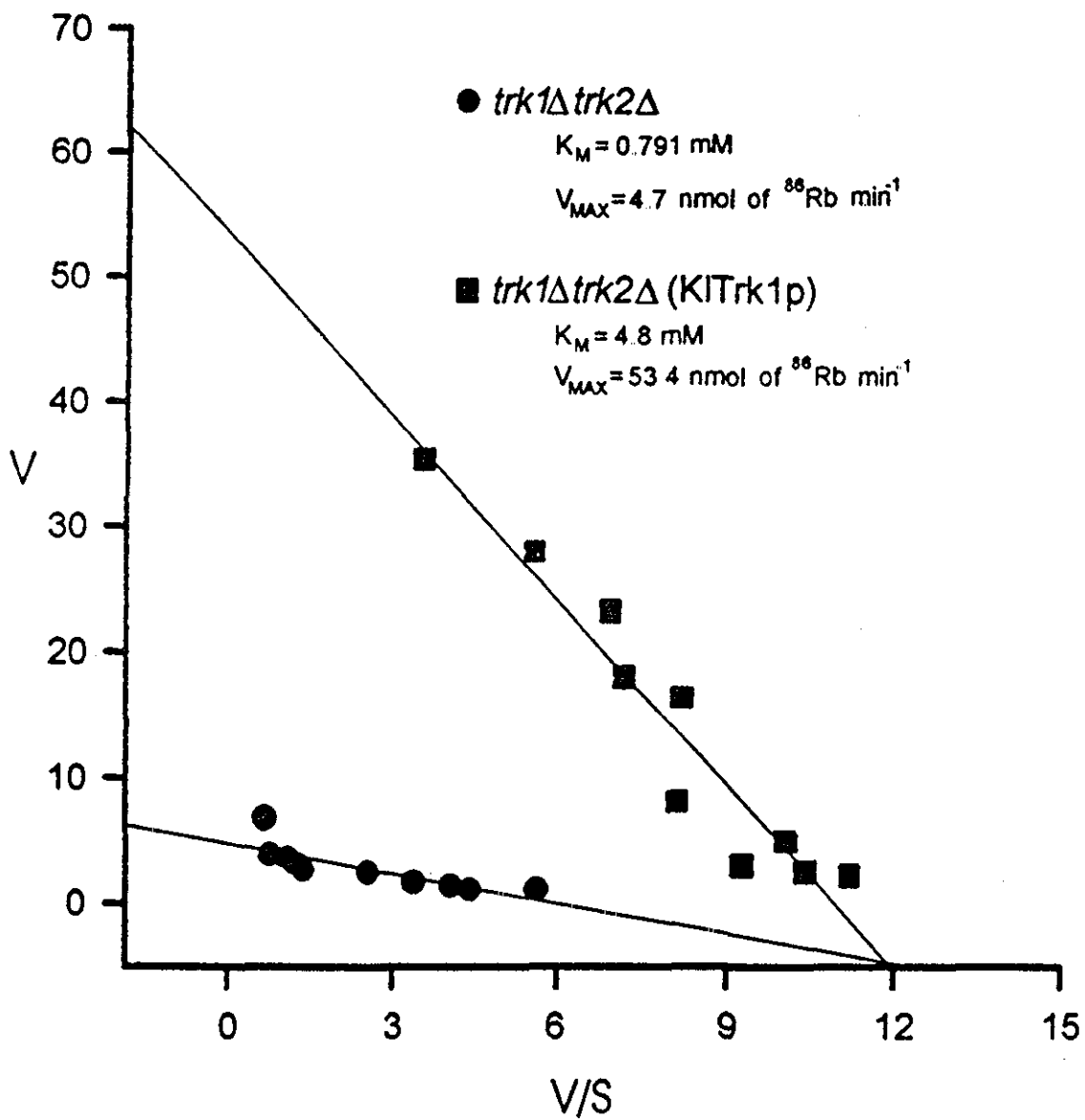


Fig 4B

El caso de los canales iónicos en la levadura

En la actualidad los mecanismos de permeabilidad y selectividad de los canales de potasio con un solo dominio de poro han sido caracterizados hasta nivel de estructura tridimensional. Se sabe que estos canales se asocian en homotetrámeros o heterotetrámeros para ser funcionales. Se ha visto que esta característica se puede extrapolar a otras familias de canales tales como los de Na^+ y los Ca^{2+} , cuya organización comprende la estructuración de cuatro dominios homólogos, donde cada uno de ellos contribuye de la misma manera a la formación del poro del canal.

Por una parte, se comienzan a estudiar los procesos de permeabilidad y selectividad de los canales con dos dominios de poro. Los filtros de selectividad en esta familia generalmente son diferentes entre sí. Es decir, la secuencia entre uno y otro poro en un mismo canal varía. Por otra parte, se desconoce como es la interacción entre los dominios de poro, pero se especula que los miembros de esta familia se asocian en dímeros para que se puedan dar los procesos cinéticos típicos de estas proteínas.

Se sabe poco de los canales de potasio con dos regiones de poro. Algunas de las principales preguntas que se pueden hacer son ¿Cuál es el significado funcional de la presencia de dos poros en tándem? ¿Cuál es la contribución de cada uno de los dominios de poro a la permeabilidad y a la selectividad por el potasio? Con base en las respuestas a estas preguntas, se puede obtener información muy importante en el tema de la selectividad, así como de la estructura cuaternaria de la proteína, ya que se ha propuesto que esta familia de canales se acomodan en dímeros en la membrana [Lesage, 2000], a diferencia de los canales de potasio con una sola región de poro que se acoplan en tetrámeros [Jan, 1997].

HIPÓTESIS:

La hipótesis de este trabajo fué que ambos dominios de poro presentes en el canal TOK1 serían funcionales de manera independiente y que podrían complementar a la mutante Δtrk1 , Δtrk2 de *S. cerevisiae*, que es deficiente en ambos sistemas de transporte de potasio. Esta hipótesis se basa en el hecho de que potencialmente ambos canales serían selectivos a potasio, debido a la similitud estructural que presentan con las familias de canales de potasio ya descritas con anterioridad.

OBJETIVO:

Para estudiar cual es la contribución a la selectividad y a la permeabilidad por potasio de cada uno de los dos dominios de poro de TOK1, se planteó como objetivo separar los dominios y expresarlos independientemente o en conjunto en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Utilizar los canales TOK1A y TOK1B para complementar la doble mutante *Δtrk1 Δtrk2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Caracterizar fisiológicamente las cepas en las que se haya complementado la doble mutante *Δtrk1 Δtrk2* de *S. cerevisiae*

Caracterizar electrofisiológicamente los canales generados a partir de la fisión de TOK1, expresándolos en ovocitos de *Xenopus laevis*

RESULTADOS PARTE II

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la expresión por separado de los dos dominios de poro del canal TOK1. Los resultados presentados en esta sección permiten entender con mayor detalle un aspecto hasta ahora oscuro en la biofísica de los canales de potasio: ¿Cuál es el papel de los dos dominios de poro en la permeabilidad y selectividad de esta familia de canales de potasio?

Los resultados obtenidos en este estudio fueron sometidos y aceptados para su publicación en la revista *Journal of Biological Chemistry*, bajo el título:

Splitting the two-pore-domains from TOK1 result in two cationic channels with novel functional properties

Carlos Saldaña, David Naranjo, Roberto Coria, Antonio Peña y Luis Vaca

Vol. 277, No 7 febrero 15 pp4797-4805. 2002

Splitting the Two Pore Domains from TOK1 Results in Two Cationic Channels with Novel Functional Properties*

Received for publication, August 17, 2001, and in revised form, October 24, 2001
Published, JBC Papers in Press, November 19, 2001, DOI 10.1074/jbc.M107957200

Carlos Saldaña†§, David Naranjo¶, Roberto Coria‡, Antonio Peña‡, and Luis Vaca§||

From the ‡Departamento de Genética Molecular, ¶Biofísica y §Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

Potassium channels are membrane-spanning proteins with several transmembrane segments and a single pore region where ion conduction takes place (Biggin, P. C., Roosild, T., and Choe, S. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 456–461; Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* 280, 69–77). TOK1, a potassium channel identified in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was the first described member from a growing new family of potassium channels with two pore domains in tandem (2P) (Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995) *Nature* 376, 690–695). In an attempt to understand the relative contribution of each one of the 2P from TOK1 to the functional properties of this channel, we split and expressed the pore domains separately or in combination. Expression of the two domains separately rescued a potassium transport-deficient yeast mutant, suggesting that each domain forms functional potassium-permeable channels in yeast. In *Xenopus laevis* oocytes expression of each pore domain resulted in the appearance of unique inwardly rectifying cationic channels with novel gating and pharmacological properties. Both pore domains were poorly selective to potassium; however, upon co-expression they partially restored TOK1 channel selectivity. The single channel conductance was different in both pore domains with 7 ± 1 ($n = 12$) and 15 ± 2 ($n = 12$) picosiemens for the first and second domain, respectively. In light of the known structure of the *Streptomyces lividans* KcsA potassium channel pore (see Doyle *et al.* above), these results suggest a novel non-four-fold-symmetric architecture for 2P potassium-selective channels.

Potassium channels play key roles in the physiology of prokaryotic and eukaryotic organisms. In many cells, potassium channels are responsible for maintaining the resting membrane potential and for the modulation of firing properties in excitable cells (4). The exceptionally diverse functional properties of potassium channels are matched by a large number of genes identified over the last few years (5).

Genome sequencing and molecular cloning has allowed the identification of a significant number of potassium channels

possessing two and six transmembrane domains (TM)¹ (5). Despite the structural diversity, all these channels have a common feature consisting of a single pore-forming domain, which is essential for ion conduction and selectivity (1, 2). It is generally accepted that all these potassium channels aggregate as tetramers to form a functional channel, leaving the pore at the axis of a four-fold symmetry (1, 6).

Recently a new family of potassium channels characterized by the presence of two pore-forming domains in tandem (2P) has been identified (3, 7–9). These new potassium channels have either four (2P/4TM) or eight (2P/8TM) transmembrane segments and are highly conserved throughout evolution (7, 11, 12). Recent experimental evidence suggests that this family of potassium channels probably dimerizes to form functional channels (8). In general, the sequences of both selectivity filters of 2P channels are different, thus they are expected to make potassium-selective pores without the regular four-fold symmetry, but the functional significance of having two different pore-forming domains remains largely unknown.

TOK1 was the first member identified from the 2P family of potassium channels (3). This is the only member from this family possessing eight TM (2P/8TM). The arrangement of the putative TM and the 2P in TOK1 results in a structure that resembles a six TM Shaker-like channel attached to an inward rectifier-like channel. This potassium channel may be important for the maintenance of membrane voltage in yeast, which is essential for nutrient uptake and turgor regulation (10).

Despite over 60 genes identified so far encoding 2P potassium channels, very little is known about the functional significance of having two pore-forming domains in tandem. In an attempt to determine the role of each one of the two pore-forming domains in this new family of potassium channels, we divided TOK1 at the intracellular linker between the sixth and seventh TM to produce two structures that resemble single pore domain channels, one with 6TM and the other with 2TM, each one with its respective pore-forming domain.

The results presented here indicate that each construct can form functional potassium channels in yeast and *Xenopus laevis* oocytes showing poor ionic selectivity and novel gating and pharmacological properties. Co-expression of both constructs partially restored wild type TOK1 channel properties. Given the proposed pore structure for 1P potassium channels based on the crystal structure of the KcsA potassium channel (2), these results suggest a novel non-four-fold-symmetric architecture to attain potassium-selective pores

* This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (to L. V., D. N., R. C., and A. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel.: 525-622-5654; Fax: 525-622-5611; E-mail: lvaca@ifisiol.unam.mx

¹ The abbreviations used are: TM, transmembrane domain(s); 2P, two pore domains in tandem; 1P, one pore domain; P1, first pore; P2, second pore; HOMOPIPES, homopiperazine-*N,N'*-bis-2-(ethanesulfonic acid); MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; CHO, Chinese hamster ovary; HEK, human embryonic kidney; pF, picofarads.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

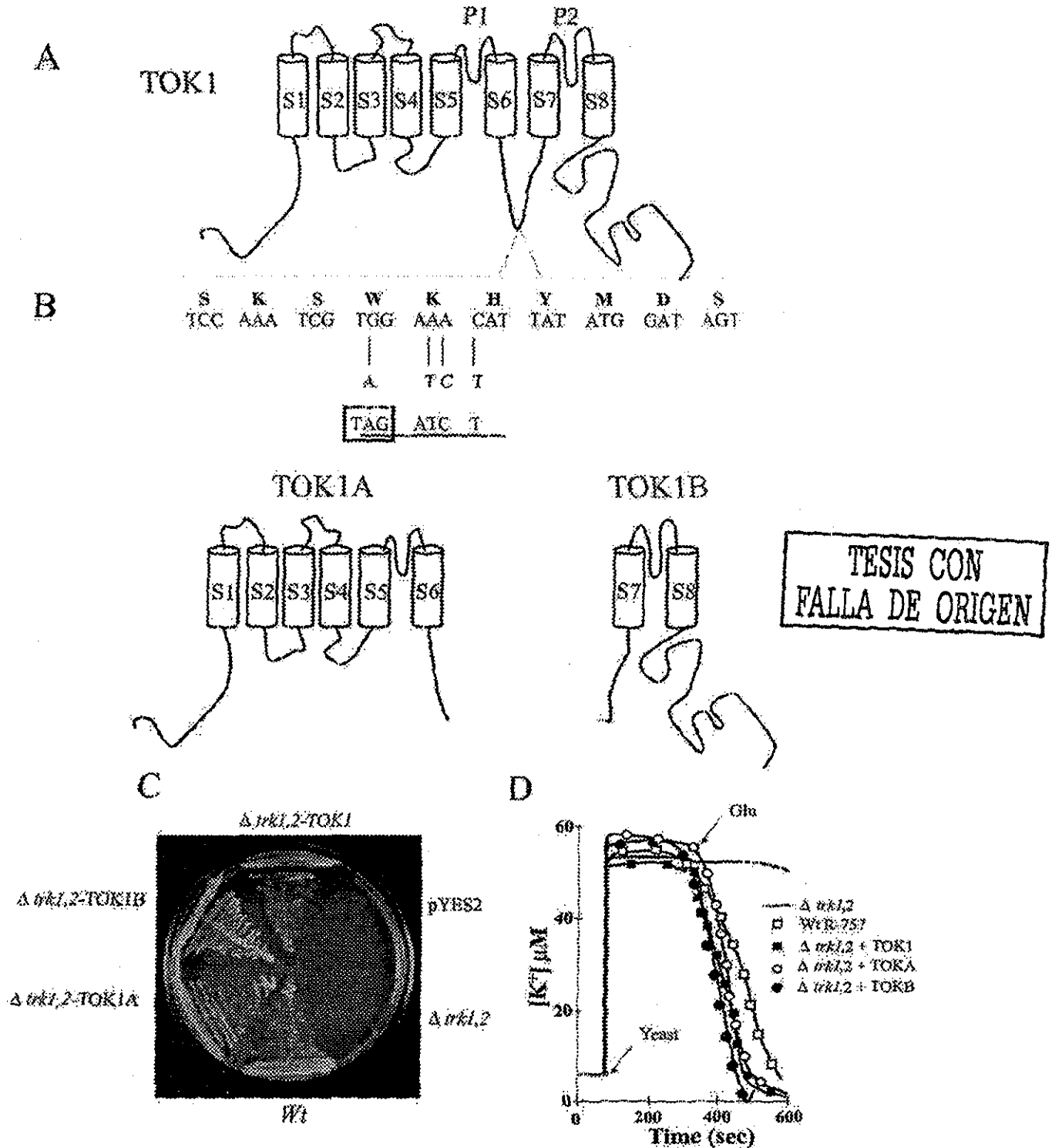


FIG. 1. Proposed membrane topology of wild type TOK1, TOK1A, and TOK1B channels. *A*, hypothetical TOK1 structure with eight transmembrane helices and two pore domains in tandem. The first pore (P1) domain is located between the fifth and sixth transmembrane segments, and the second pore (P2) domain is located between the seventh and eighth transmembrane segments. *B*, we introduced a stop codon after methionine 351 and the endonuclease restriction site (*Bgl*II) by mutagenic PCR to separate the two pore domains from TOK1 and divide the channel in to two structures that resemble single pore potassium channels. The first structure contained six transmembrane segments (TOK1A), and the second contained two transmembrane segments (TOK1B). *C*, complementation of the potassium uptake-deficient *S. cerevisiae* yeast mutant ($\Delta trk1, \Delta trk2$) by pYES2-TOK1, pYES2-TOK1A, and pYES2-TOK1B. The double mutant yeast cells were transformed with constructs indicated in the figure and grown in SD-URA medium supplemented with 100 mM KCl (data not shown). Transformed cells were replicated in the potassium-deficient medium (0.5 mM KCl containing 4% galactose to induce gene expression) LS-GAL and grown in this medium for 10 h. All constructs (TOK1, TOK1A, and TOK1B) rescued the double mutant, whereas the mutant transformed with the empty vector (pYES2) did not grow in potassium-deficient medium. The wild type *S. cerevisiae* yeast containing TRK1 and TRK2 (*Wt*) grew normally in potassium-deficient medium.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Solutions—All salts used were analytical grade purchased from Sigma. HEPES and MES were purchased from Calbiochem, and HOMOPIPES was from Research Organics Inc.

Production of TOK1A and TOK1B—The primers used for mutagenic PCR were 5'-AGGTCCAAATCGTAGATCTATTATATGGAT-3' and 5'-ATCCATATAATAGATCTACGATTTGGACCT-3' forward and reverse, respectively. In the forward primer, bases in bold show the nucleotides replaced, the stop codon is shown in italics, and the restriction site (*Bgl*III) is underlined. Universal primers were used to amplify the 5'- and 3'-ends of the respective constructs. The amplified fragments were cloned into pCR2.1 (Invitrogen), and constructions were sequenced in its entirety. TOK1A and TOK1B were cloned into the *Bam*HI site of pYES2 (Invitrogen) and introduced into the *Saccharomyces cerevisiae* double mutant potassium uptake-deficient yeast CY162 ($\Delta trk1, \Delta trk2$) using the lithium acetate method. For electrophysiology experiments all constructs were cloned into the *Bam*HI and *Bgl*III sites of the pGEMA vector for cRNA synthesis using the mMACHINE kit (Ambion).

Complementation Assays—The double mutant potassium uptake-deficient CY162 ($\Delta trk1, \Delta trk2$) yeast cells were transformed with TOK1, TOK1A, and TOK1B constructs and grown in SD-URA (yeast nitrogen base with 0.6% amino acids, 2% glucose, 20 mg/liter lysine, and 30 mg/liter histidine) medium supplemented with 100 mM KCl. Transformed cells were replicated in the potassium-deficient medium LS-GAL (0.5 mM KCl containing 4% galactose to induce gene expression) and grown in this medium for 2–3 days. The data shown were obtained at this time point.

Measurements of Potassium Transport in Yeast—The double mutant potassium uptake-deficient CY162 ($\Delta trk1, \Delta trk2$) yeast cells were transformed with TOK1, TOK1A and TOK1B constructs. Yeast cells were harvested by centrifugation and starved for 12 h before initiating potassium measurements. Starved cells were washed twice with distilled water, suspended at a density of 6×10^9 cells/ml, and kept on ice until use. Aliquots of 0.5 ml were applied to the recording chamber containing a potassium-selective electrode (Corning) adapted with a valinomyacin membrane. The electrode was connected to a potentiometer (Selection 2000, Beckman Instruments). The output signal from the potentiometer was acquired with a PC computer via an analog-digital interface and in-house-designed software (programmer Wilfrido Martinez). The data reported represent the concentration of potassium in the medium in mM after calibration with known concentrations of potassium dilutions.

Transient Expression of TOK1B in Mammalian Cells—The cDNA from TOK1B was introduced in the *Bam*HI-*Not*I sites from the pcDNA 3.1 expression vector (Invitrogen). Chinese hamster ovary (CHO) and human embryonic kidney (HEK293) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) as frozen passages. Cells were cultured using Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with antibiotics and 10% bovine fetal serum. CHO and HEK293 cells were transfected with 5 μ g of the TOK1B construct mixed with LipofectAMINE plus (Invitrogen). Cells were studied 24–48 h post-transfection.

Electrophysiology—cRNA was prepared after linearization of pGEMA containing TOK1, TOK1A, and TOK1B with *Not*I and transcribed with T7 as described previously (3). Transcript concentration was estimated spectrophotometrically. Oocytes were isolated as described elsewhere (11) and injected with 46 nl of distilled water containing 5–10 ng of cRNA of the construct to be studied. Whole oocyte currents were recorded 1–4 days after injection using a two-electrode voltage-clamp system (Oocyte Clamp, Warner Instruments). Electrodes filled with 3 M KCl, 1 mM EGTA, 5 mM HEPES-KOH (pH 7.0) showed resistances of 0.3–1.0 megaohms. Recordings were performed under constant perfusion at room temperature. The low potassium bath solution contained 2 mM KCl, 98 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.3 mM CaCl₂. In the high potassium bath solution the KCl concentration was 100 mM. All solutions were adjusted with 5 mM HEPES (pH 7), 5 mM MES (pH 6), or 5 mM HOMOPIPES (pH 5). Patch clamp experiments in the outside-out configuration were performed with an EPC-9 amplifier (HEKA Electronics). Ensemble averages were prepared with Igor Pro 4 (WaveMetrics). In these experiments the pipette contained the 100 mM

KCl solution, and the bath contained the 2 mM KCl solution described above. The relative permeability calculations were performed according to the Goldman-Hodgkin-Katz equation as described elsewhere (4). In all cases, combined data represent the mean \pm S.D. from *n* independent observations.

RESULTS

Dividing the Two Pore Domains from TOK1 Produces Novel Cationic Channels—TOK1 possesses eight transmembrane segments with two pores in tandem. This structure resembles a six transmembrane domain Shaker-like channel attached to an inward rectifier-like channel (Fig. 1A), therefore, dividing the two pore-forming domains from this channel would result in two structures that resemble single pore potassium channels. The first structure consists of six TM segments with the first pore (P1) domain located between the fifth and sixth TM segments (TOK1A, Fig. 1B), and the second structure has two TM segments containing the second pore (P2) domain between the two segments (TOK1B, Fig. 1B).

Separate expression of each construct in the potassium transport-deficient *S. cerevisiae* double mutant ($\Delta trk1, \Delta trk2$) (12) overcame the potassium auxotrophy as illustrated in Fig. 1C. This result indicates that both constructs may function as individual potassium channels in yeast. This yeast potassium transport-deficient mutant has been previously used to identify a novel 2P potassium channel from *Drosophila melanogaster* (ORK1) (13) and the voltage-dependent potassium channel from *Arabidopsis thaliana* (KAT1) (14) utilizing a complementation strategy similar to the one reported here. This strategy relies on the fact that this mutant cannot grow in potassium-deficient medium. Fig. 1C shows that the mutants transformed with wild type TOK1, TOK1A, or TOK1B are rescued only when exposed to a galactose medium to induce plasmid expression. Furthermore, transformed mutants grown in glucose, where plasmid induction does not occur, did not grow in potassium-deficient medium (data not shown).

Experiments performed with a potassium-selective electrode show a clear potassium uptake-deficient phenotype in $\Delta trk1, \Delta trk2$ (Fig. 1D). This phenotype has been studied previously using similar measurements and reflects the role in potassium uptake played by the only two potassium transport systems functionally identified in this yeast (TRK1 and TRK2 (15)). The addition of glucose to the medium results in the activation of the H⁺-ATPase from yeast (PMA1) with the concomitant establishment of the cell potential via this proton transport system. Unlike animal cells, in yeast the membrane potential is largely determined by the activity of this electrogenic ATPase (16). Under these conditions, glucose addition establishes an electrochemical gradient initiating the uptake of potassium into wild type yeast cells via the high affinity potassium transport systems (TRK1 and TRK2).

As expected, the double mutant $\Delta trk1, \Delta trk2$ yeast cells do not show potassium uptake due to the absence of both potassium transporters (Fig. 1D). This potassium uptake-deficient phenotype is reversed in the double mutant $\Delta trk1, \Delta trk2$ yeast cells transformed with wild type TOK1 (Fig. 1D). The rescue of the potassium-deficient phenotype from the $\Delta trk1, \Delta trk2$ double mutant by overexpression of TOK1 has been previously documented (17).

Interestingly, the separate expression of TOK1A or TOK1B also rescued the $\Delta trk1, \Delta trk2$ phenotype (Fig. 1D). In fact, po-

D, representative potassium uptake measurements using a potassium-selective electrode. The vertical arrow (Yeast) indicates the time of addition of yeast aliquots to the recording chamber. The second arrow (Glu) illustrates the time of glucose addition to the medium. Downward deflections indicate potassium removal from the medium (yeast uptake). The traces shown are for wild type R-757 yeast (Wt, open squares), double mutant ($\Delta trk1, \Delta trk2$, solid line), and double mutant transformed with TOK1 (filled squares), TOK1A (open circles), and TOK1B (closed circles). Yeast cells were prepared and starved as indicated under "Materials and Methods."

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tassium uptake from *Δtrk1, Δtrk2* yeast cells transformed with the three constructs (TOK1, TOK1A, or TOK1B) was indistinguishable by this technique (Fig. 1D). These results indicate that TOK1A and TOK1B contribute to potassium uptake in the double mutant either directly by producing potassium-permeable channels or indirectly via the activation of otherwise silent endogenous potassium transport systems from yeast. The later possibility is less likely since TRK1, TRK2, and TOK1 are the only known potassium pathways functionally identified and recognized by genome analysis in this yeast.

To further explore the possibility that TOK1A and TOK1B may produce functional channels, both constructs were expressed separately in *X. laevis* oocytes. Water-injected oocytes showed inward currents smaller than 0.3 μ A at -160 mV (Fig. 2). The amplitude of these currents is in agreement with what other groups have observed in *X. laevis* obtained from different suppliers (18, 19).

Injection of mRNA from each construct (TOK1A or TOK1B) separately into oocytes resulted in the appearance of inwardly rectifying channels with novel functional properties (Fig. 2). Unlike TOK1, which is a depolarization-activated outwardly rectifying potassium channel, both constructs (TOK1A and TOK1B) produced hyperpolarization-activated channels showing a strong inward rectification (Fig. 2A). The rectification was so strong that no outward currents were detected even at potentials as positive as +100 mV (data not shown).

One cannot discard at this point, however, the possibility that expression of TOK1A and TOK1B may result in the activation of endogenous and otherwise silent oocyte channels. Weakly potassium-selective and chloride conductances activated by hyperpolarization have been previously described in oocytes injected with IsK (20, 21), Mat-8 (22), and the γ subunit from the Na^+ - K^+ -ATPase (23).

In an attempt to clarify this point, TOK1B was introduced in a mammalian expression vector (see "Material and Methods") and transiently expressed in CHO and HEK293 cells. Expression of TOK1B in these two mammalian cell lines resulted in the appearance of inwardly rectifying, hyperpolarization-activated currents similar to those illustrated in Fig. 2 (data not shown).

Nontransfected CHO cells showed small inward currents of 5 ± 1.5 pA/pF at -160 mV measured at pH 6 (12 ± 2 pF/cell, $n = 25$). Approximately 50% of the CHO cells transfected with TOK1B displayed large inward currents (150 ± 12 pA/pF at -160 mV, $n = 15$). Similar results were obtained in HEK293 cells where inward currents under control conditions at -160 mV were 7 ± 3 pA/pF (17 ± 4 pF/cell, $n = 22$). After transfection with TOK1B ~60% of the cells showed large inward currents of 210 ± 52 pA/pF at -160 mV measured at pH 6 ($n = 14$).

Unfortunately these two cell lines did not tolerate extracellular acidification below pH 6, making any further studies of the effect of pH on gating and single channel conductance with these constructs extremely difficult. Nevertheless, these preliminary results provide additional information strongly suggesting that expression of TOK1A and TOK1B may produce functional channels rather than activate endogenous and otherwise silent channels in yeast, oocytes, rodent, and human cells.

Modulation of TOK1, TOK1A, and TOK1B by Extracellular Acidification—One common feature found in many 2P potassium channels is their modulation by protons TOK1 (24) and the TWIK (25) subfamily of channels are inhibited by intracellular acidification, whereas increasing the extracellular pH above 7 activates the members of the TASK subfamily of channels (26)

We have found that TOK1 is also modulated by extracellular pH. Extracellular acidification increased the amount of inward current through wild type TOK1 with little effect on the outward current (Fig. 2A). Above pH 6 TOK1 showed a strong outward rectification, whereas at pH 5 a significant amount of inward current was detected (Fig. 2A). The inward current carried by wild type TOK1 at pH 5 resembled the current produced by the expression of TOK1A or TOK1B separately (Fig. 2A).

Extracellular acidification also increased the amount of inward current through TOK1A and TOK1B and reduced the time to reach the peak inward current at all voltages explored. Fitting the inward current obtained between -130 and -160 mV to a single exponential function produced the activation time constants (τ) shown in Table I. In general membrane hyperpolarization reduced the time to reach the peak inward current at the three pH values explored for TOK1A and TOK1B; however, the time constants obtained at pH 7 were 10–20 times slower compared with pH 5 (Table I).

Interestingly, despite the clear structural differences between TOK1A and TOK1B (TOK1A possesses six TM, and TOK1B has only two TM), both constructs produced channels with similar activation kinetics, pH effects, and inward rectification properties. If indeed these constructs produce functional channels, such results would suggest that the pore domain (the only conserved sequence in both structures) might determine these properties.

Co-injection of TOK1A and TOK1B Partially Restores TOK1 Channel Properties—Since the separate expression of TOK1A and TOK1B appear to produce functional channels, the next obvious question to explore is whether co-expression of both constructs may reconstitute functional TOK1 channels. To investigate this, oocytes were co-injected with equimolar concentrations of both constructs. Co-injection of mRNA from TOK1A and TOK1B (TOK1AB) partially restored wild type TOK1 channel properties as indicated by the appearance of a significant amount of outward current at voltages more positive than 0 mV in the co-injected oocytes (Fig. 3A). Partial co-assembly of TOK1A and TOK1B channels to form wild type TOK1 was further suggested by selectivity experiments where the current produced by TOK1AB showed a more negative reversal potential (-74 ± 3 mV, $n = 10$; Fig. 3C) than the individual injection of TOK1A (-22 ± 4.4 mV, $n = 9$; Fig. 3D) or TOK1B (-42 ± 2.6 mV, $n = 8$; Fig. 3E). Under these conditions the reversal potential observed for wild type TOK1 was -76.5 ± 3 mV ($n = 10$; Fig. 3B). Calculating the relative permeability ratios using the Goldman-Hodgkin-Katz equation gave a PK^+/PNa^+ of >200 for TOK1 \geq TOK1AB, 5 for TOK1B, and 2.4 for TOK1A. Due to the strong inward rectification observed with TOK1A and TOK1B, the reversal potentials were measured using voltage protocols to elicit tail currents (Fig. 3A). Thus, in addition to the fact that TOKA and TOKB are inward rectifiers, they are poorly potassium-selective.

Pharmacological experiments further strengthened the possibility of co-assembly between TOK1A and TOK1B to form wild type TOK1 channels. Wild type TOK1 is inhibited by triethanolamine with $K_i = 5$ mM (3). TOK1A and TOK1B were not blocked by triethanolamine concentrations up to 20 mM, whereas 10 mM triethanolamine inhibited 75% of the current produced by TOK1AB (data not shown). All these results strongly suggest that in the co-injection of TOK1A and TOK1B part of the protein may associate to reconstitute TOK1 channels.

Characterization of TOK1A and TOK1B Single Channels—Single outside-out patches obtained from TOK1A- and TOK1B-expressing oocytes demonstrated further novel properties from

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

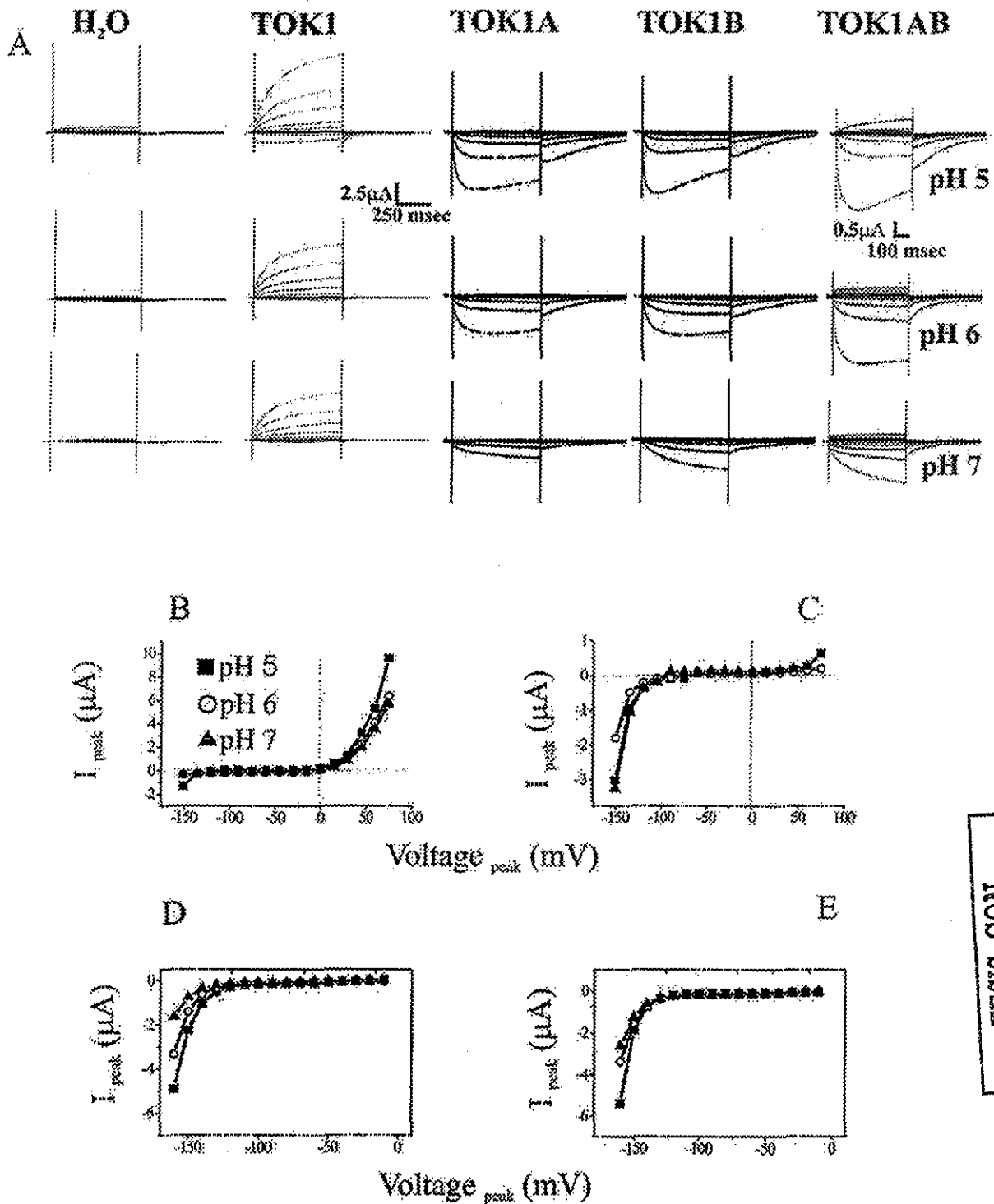


FIG. 2 Novel cationic channels obtained after oocyte injection with cRNA from TOK1A and TOK1B. A, representative whole oocyte currents obtained at pH 5, 6, and 7 from oocytes injected with 5–10 ng of cRNA for the wild type TOK1, TOK1A, TOK1B, and the co-injection of TOK1A and TOK1B (TOK1AB). H₂O indicates water-injected oocytes. The voltage protocols used are shown in the upper panels. Current-voltage relationships obtained at the peak current for each voltage step at pH 5, 6, and 7 (indicated in the figure) for wild type TOK1 (B), TOK1AB (C), TOK1A (D), and TOK1B (E) are shown. The right label indicates the amount of peak current in μA. The bath solution used was 100 mM KCl (see “Material and Methods”). Currents from TOK1- and TOK1AB-injected oocytes were generated after pulsing from –80 mV (holding potential) to the test potential of –150 mV to +75 mV in 15-mV increments (interpulse duration of 3 s). Currents from TOK1A- and TOK1B-injected oocytes were generated with a similar protocol except that the pulse increment was –10 mV.

both constructs. The single channel conductance for TOK1 is 35 picosiemens (3). Oocytes obtained from six different animals were injected with mRNA from TOK1A or TOK1B. Outside-out patches obtained from these cells showed multiple channels

of equal amplitude for each construct. The single channel conductance calculated between –100 and –160 mV from patches with a single channel showed clear differences between TOK1A and TOK1B. The conductance obtained from

TABLE I

Time constants for the activation of TOK1A and TOK1B whole oocyte currents and single channels

The values shown are in milliseconds. All currents were fitted to a single exponential rise equation. Because of the current inactivation observed at the end of the voltage pulse at pH 5, the fit limit was set between the beginning of the voltage pulse and 250 ms. This applies for whole oocyte currents and the ensemble averages from single channels. Single channel ensemble averages were obtained from 20–30 sweeps like those shown in Fig. 4.

	-130 mV	-140 mV	-150 mV	-160 mV
TOK1A				
Whole oocyte				
pH 5	100	63	35	18
pH 6	167	129	76	30
pH 7	1174	590	330	218
Single channel				
pH 5	99	70	42	21
pH 6	165	130	73	32
pH 7	1182	601	335	220
TOK1B				
Whole oocyte				
pH 5	60	39	20	8
pH 6	170	114	72	40
pH 7	373	318	229	169
Single channel				
pH 5	58	41	17	6
pH 6	169	120	71	44
pH 7	342	311	226	171

TOK1A was 7 ± 1 ($n = 12$) and was 15 ± 2 ($n = 12$) picosiemens for TOK1B (Fig. 4C).

The identification of single channels from TOK1A and TOK1B was based on the following observations. (a) These channels were observed only in outside-out patches from oocytes expressing the respective constructs and never in water-injected oocytes ($n = 9$ from three different animals) or in oocytes injected with the cRNA for the human bradykinin type II receptor ($n = 12$ from four different animals) used as control of injection, (b) both channels responded to changes in extracellular acidification similarly to whole oocyte currents, and (c) single channel ensemble averages from both constructs resembled whole oocyte currents (compare Fig. 2A with Fig. 4, B and E). Fitting the ensemble averages to exponential function produced time constants that were indistinguishable from those obtained with whole oocyte currents (Table I).

Although direct measurements of the reversal potentials for TOK1A and TOK1B were not possible due to the reduction in single channel amplitude and channel open probability near the reversal potential, fitting the data to the Goldman-Hodgkin-Katz equation produced estimated reversal potentials similar to those obtained with whole oocyte currents. The extrapolated reversal potential for TOK1A was -15 ± 5 mV ($n = 12$) and -50 ± 6 mV for TOK1B ($n = 16$; Fig. 4C). In both constructs, no measurable channel activity was detected in the outward direction, confirming the strong inward rectification observed with whole oocyte currents.

Modulation by extracellular acidification was evident also at the single channel level. Fitting the current produced by the ensemble average of many single channel recordings to a single exponential function gave τ values indistinguishable from those obtained at the three pH values explored with whole oocyte currents (Table I).

These experiments indicate that the increment in inward current amplitude through TOK1A and TOK1B observed with extracellular acidification is not the result of changes in the single channel conductance but rather due to an increment in open probability (P_o). The effect of membrane hyperpolarization and extracellular acidification on TOK1A and TOK1B single channels is illustrated in Fig. 5. Single channel P_o de-

cayed exponentially with membrane depolarization (Fig. 5B). No distinguishable single channel activity was observed at potentials more positive than -100 mV. The strong voltage dependence observed with TOK1A and TOK1B single channels may explain the inward rectification obtained with whole oocyte currents.

Extracellular acidification increased channel P_o at all voltages explored in TOK1A and TOK1B (Fig. 5, B and C), thus the modulation of single channel gating by acidification was consistent with the effects obtained with whole oocyte currents for both constructs (Fig. 2). The results presented here may explain why extracellular acidification unmasks inward currents through wild type TOK1 channels, suggesting that this may be the result of changes in channel gating and voltage dependence in the wild type channel.

The fact that water-injected oocytes and oocytes injected with the mRNA encoding the human type II bradykinin receptor (control of injection) did not produce hyperpolarization-activated currents or single channels similar to TOK1A or TOK1B taken together with the appearance of inwardly rectifying currents in CHO and HEK cells transfected with TOK1B suggest that these constructs may produce functional channels rather than activate endogenous channels. Furthermore, the reconstitution experiments using combined injections of TOK1A and TOK1B (TOK1AB) can only be satisfactorily explained if a fraction of both constructs interact to form TOK1 wild type channels.

DISCUSSION

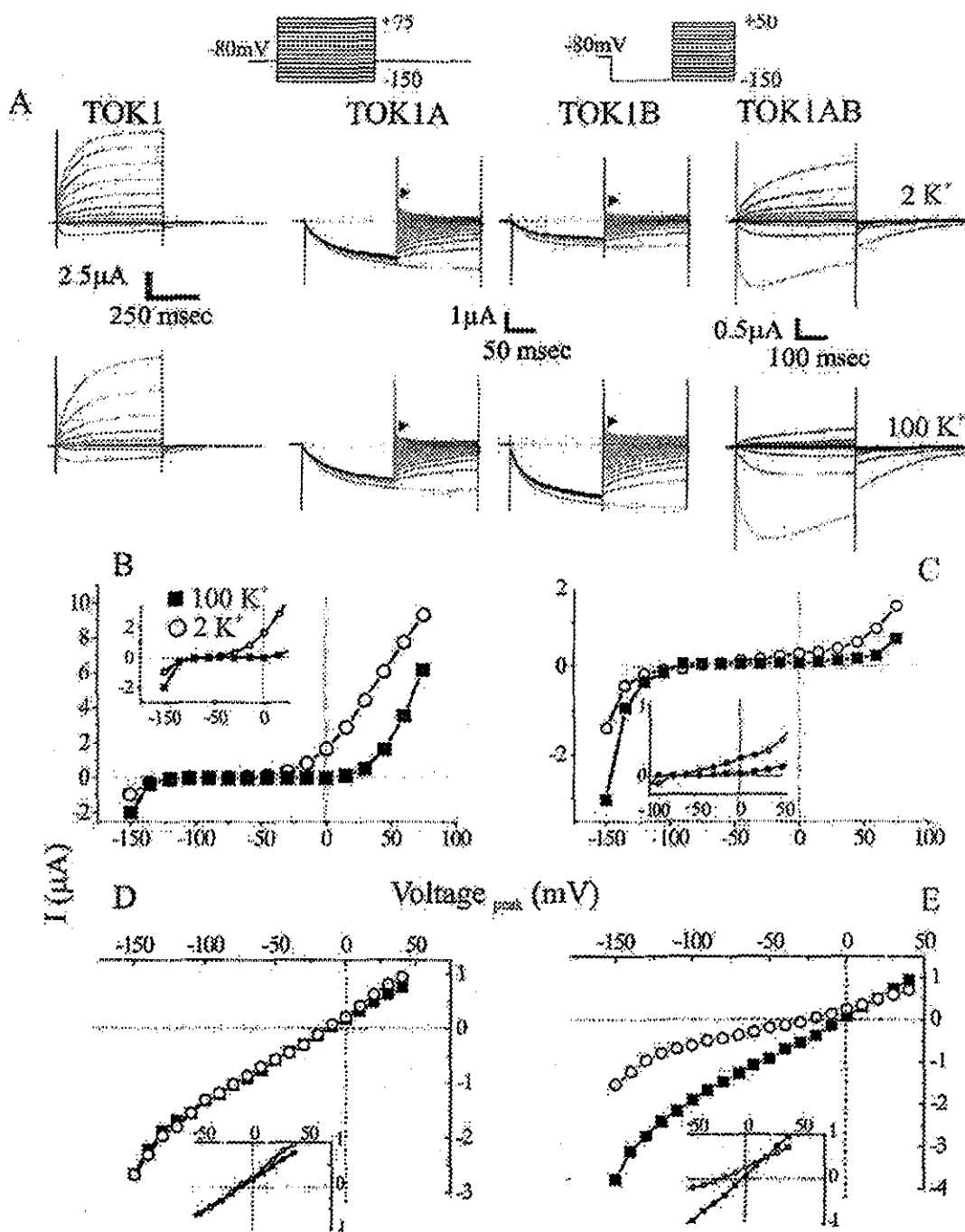
We have divided a 2P potassium channel with eight TM to produce two constructs that resemble single pore potassium channels, one with two TM resembling a Kir-like inward rectifier potassium channel and the other with six TM resembling an outward rectifier of the Kv family of potassium channels.

Expression of the two domains separately overcame the potassium auxotrophy in the potassium transport-deficient yeast double mutant $\Delta trk1, \Delta trk2$. Furthermore, experiments measuring potassium uptake with a potassium-selective electrode showed a clear phenotype in the $\Delta trk1, \Delta trk2$ double mutant, consisting in a reduced potassium uptake compared with that in wild type yeast. This phenotype was rescued by transforming the double mutant with plasmids containing wild type TOK1, TOK1A, or TOK1B separately.

Electrophysiology experiments performed with *X. laevis* oocytes injected with TOK1A and TOK1B mRNA showed the appearance of inwardly rectifying, hyperpolarization-activated cationic currents not present in oocytes injected with mRNA from the human type II bradykinin receptor or in water-injected oocytes. Similar cationic currents were also observed in CHO and HEK293 cells transiently transfected with a plasmid containing the cDNA from TOK1B.

Although it is possible that TOK1A and TOK1B (which share limited amino acid homology and are structurally very different) may be activators of cationic channels in yeast, oocytes, rodent, and human cells, we believe this hypothesis is less likely than that in which both constructs (which have the general features found in 1P potassium channels) may indeed produce functional cationic channels.

Intersubunit interactions of the 2P from TOK1 may account for the differences in selectivity and single channel conductance observed between the wild type channel and both constructs (TOK1A and TOK1B). In this regard, it is worth mentioning that even when the amount of mRNA injected in the TOK1AB experiments was the same as that injected for TOK1A or TOK1B separately the amplitude of current produced by the co-injection was one-third of that obtained with the individual injection of the constructs.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

FIG. 3. TOK1A, TOK1B, and TOK1AB produce channels with different potassium selectivity. A, representative whole oocyte currents from oocytes injected with 5–10 ng of cRNA of the wild type TOK1, TOK1A, TOK1B, and TOK1AB obtained with 2 and 100 mM KCl extracellular solutions. TOK1 and TOK1AB currents were elicited with the voltage protocol illustrated at the top left margin of the figure (the same protocol as used in Fig. 2). Because of the strong inward rectification, TOK1A and TOK1B current measurements were obtained from the tail currents elicited with the voltage protocol shown at the right. The arrows indicate the point at which the current measurements were obtained to construct the current-voltage curves. Current-voltage relationships for the wild type TOK1 (B), TOK1AB (C), TOK1A (D), and TOK1B (E) are shown. The insets show a magnification to demonstrate the reversal potential shift obtained with 2 mM KCl solution adjusted to pH 6

This observation is particularly important for two reasons. 1) If TOK1A and TOK1B are activators of endogenous channels, one would expect equivalent current amplitudes in the coinjection experiments and not less current as we have observed. This observation further supports the hypothesis that TOK1A and TOK1B may produce functional cationic channels; and 2) these observations suggest that some tetrameric combinations might result in nonfunctional or nonconducting chan-

nels. Homotetramers of TOK1A or TOK1B and the heterotetramer TOK1AB result in functional channels; however, it is possible that heterotetramerization of three TOK1A plus one TOK1B or vice versa may result in nonfunctional channels. Ongoing experiments with TOK1A and TOK1B constructs cloned in tandem may help to elucidate this point.

If TOK1A and TOK1B are indeed producing cationic channels with similar properties, these results are particularly

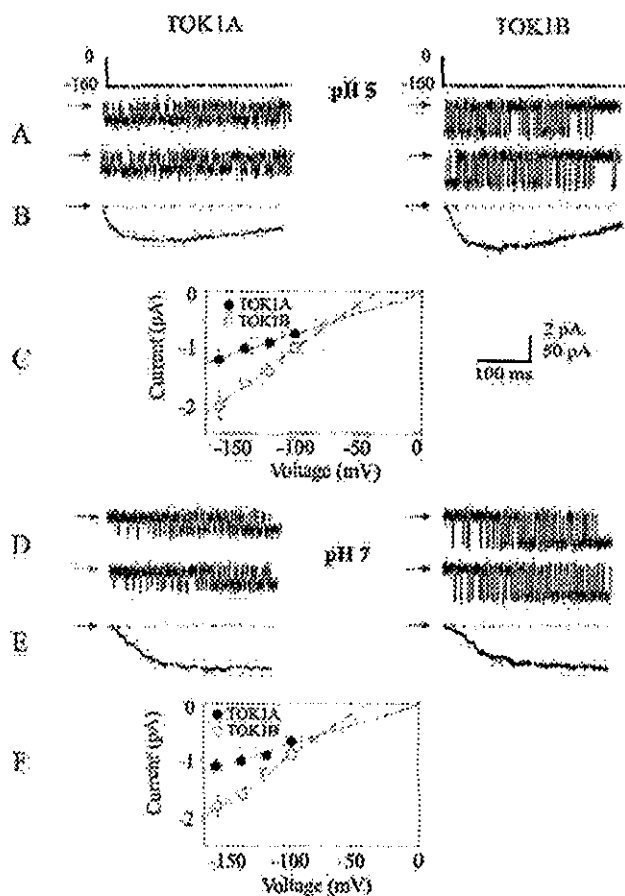


FIG. 4. Single channel recordings obtained from oocytes expressing TOK1A and TOK1B. *A*, representative single channel recordings from oocytes expressing TOK1A and TOK1B at extracellular pH 5. *B*, single channel ensemble averages from 20–30 sweeps like those shown in *A* for TOK1A and TOK1B. *C*, single channel current-voltage relationships for TOK1A (filled circles) and TOK1B (hollow circles) at pH 5. *D*, representative single channel recordings obtained at extracellular pH 7 for TOK1A and TOK1B. *E*, single channel ensemble averages from 20–30 sweeps obtained at extracellular pH 7 for TOK1A and TOK1B. The scale shows 2 pA for the single channel currents, 50 pA for the ensemble averages, and 100 ms. *F*, single channel current-voltage relationships obtained at pH 7 for TOK1A (filled circles) and TOK1B (hollow circles). The solid lines represent the fit to the Goldman-Hodkin-Katz equation to obtain relative permeability ratios of $PK^+/PNa^+ = 2.4$ and 5 for TOK1A and TOK1B, respectively. The symbols illustrate the mean \pm S.D. Where not shown error bars are smaller than symbols.

striking given the structural differences in both constructs (2TM versus 6TM), which may suggest that the pore domain (the only conserved sequence between them) might be the structure responsible for these functional properties. Considering that the individual expression of TOK1A and TOK1B results in channels with poor selectivity for potassium ions whereas TOK1AB and wild type TOK1 produced potassium-selective channels, one might speculate that the spatial rearrangement of the two pores from both constructs to form wild type TOK1 may provide a non-four-fold-symmetric potassium-selective architecture. This architecture contrasts with the proposed four-fold-symmetric architecture for 1P potassium-selective channels based on the crystal structure of the *Streptomyces lividans* KcsA potassium channel (2).

In this regard, recent experimental evidence obtained with tandem constructs (dimers) of the 1P potassium channel Drk1 suggests that mutations that alter the symmetry of the pore

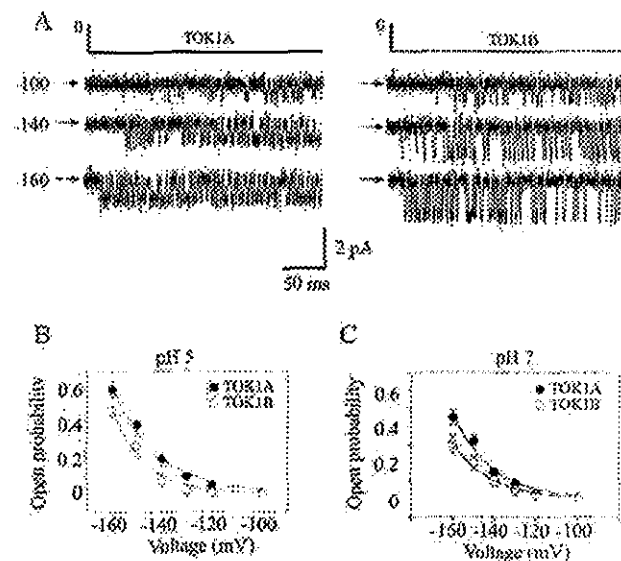


FIG. 5. Modulation by acidification of TOK1A and TOK1B single channels. *A*, representative single channel recordings obtained from outside-out patches from TOK1A- and TOK1B-injected oocytes at the voltages of -100 , -140 , and -160 mV. The scale shows 2 pA and 50 ms. The horizontal arrows point to the zero current (closed) level. Open probability versus voltage plots obtained from TOK1A- (filled circles) and TOK1B- (hollow circles)-injected oocytes at pH 5 (*B*) and 7 (*C*). The solid lines represent a fit to a single exponential decay function of the form $y = y_0 + A_1 e^{-(X - X_0)/t}$, where $y_0 = 0$, $X = -100$, $X_0 = -160$, $A_1 =$ the highest P_o value for each condition, and $t =$ time constant. In all cases the t values were not statistically different with $t = 18 \pm 3$ and $p > 0.1$. The symbols illustrate the mean \pm S.D. Where not shown error bars are smaller than symbols.

domain result in changes in selectivity, gating, and single channel conductance in the mutant dimers (27).

TOK1 is an outwardly rectifying potassium channel. Single channel openings are rarely observed in the hyperpolarized direction (3). These properties are the opposite of what we have observed with the expression of TOK1A and TOK1B. The strong inward rectification observed in TOK1A and TOK1B may result from the voltage dependence properties of both channels since single channels open scarcely at voltages approaching the reversal potential and no discernible opening events were observed in the outward direction.

In the family of inward rectifier potassium (Kir) channels, the unifying hypothesis to explain inward rectification proposes that the blockade by magnesium and/or polyamines produced by the depolarization is sufficient to account for the inward rectification in many members from this family (28). One cannot discard at the present time a similar mechanism involved in the strong rectification observed with TOK1A and TOK1B.

Alternatively, the voltage dependence and gating differences observed between wild type TOK1 and the constructs (TOK1A and TOK1B) might be the result of a different spatial arrangement of the pore architecture. We do not have a definitive explanation at the present time to account for these differences.

The structure of TOK1 resembles a six transmembrane domain Shaker-like channel attached to an inward rectifier-like channel, therefore the finding that separating the two pore-forming domains from TOK1 results in the appearance of potassium-permeable channels with novel selectivity, single channel conductance, and gating properties is very provocative.

If indeed TOK1A and TOK1B produce functional channels (as suggested by the evidence in yeast, oocytes, and mammalian cells presented here) then these new channels may provide an excellent experimental tool to explore structural determi-

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

nants of ionic selectivity, gating, and voltage dependence in 2P potassium channels and may help to understand the functional role of the sequence variations in the 2P found in this growing family of channels. Future experiments splitting the two pores from other 2P potassium channels may provide additional information about the non-four-fold-symmetric architecture of 2P potassium-selective channels.

Acknowledgments—pGEMA-TOK1 was a kind donation from Dr. Karen Ketchum (Institute for Genomic Research, Rockville, MD). We thank Velia Cardin, Alicia Sampieri, and Veronica Morales-Tlalpan for initial experiments with TOK1B-transfected mammalian cells. The services from the Molecular Biology unit, library, and computer facility at the Instituto de Fisiología Celular and the excellent technical assistance from Beatriz Aguirre, Miguel Angel Hernandez, and Gloria Salgado are greatly appreciated.

REFERENCES

- Biggin, P. C., Roosild, I., and Choe, S. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 456–461
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995) *Nature* **376**, 690–695
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed., Sinauer Associates Inc., pp. 115–139, Sunderland, MA
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, I., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., and Rudy, B. (1999) *Ann N Y Acad Sci* **868**, 233–285
- MacKinnon, R. (1991) *Nature* **350**, 232–235
- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., and Zilberberg, N. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 175–184
- Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000) *Am J Physiol. Renal Physiol* **279**, F793–F801
- Wang, Z. W., Kunkel, M. I., Wei, A., Butler, A., and Salkoff, I. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**, 286–303
- Berth, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., and Slayman, C. L. (1998) *J. Membr. Biol.* **162**, 67–80
- Garcia, E., Scanlon, M., and Naranjo, D. (1999) *J. Gen. Physiol.* **4**, 141–157
- Ko, C. H., and Gaber, R. F. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4266–4273
- Goldstein, S. A., Price, L. A., Rosenthal, D. N., and Pausch, M. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13256–13261
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J., and Gaber, R. F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3736–3740
- Gaber, R. F., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2848–2859
- Serrano, R. (1991) in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics* (Broach, J. R., Pringle, J. R., and Jones, E. W., eds) Vol. 1, pp. 523–585, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Fairman, C., Zhou, X. L., and Kung, C. (1999) *J. Membr. Biol.* **168**, 149–157
- Bauer, C. K., Falk, F., and Schwarz, J. R. (1996) *Pfluegers Arch.* **432**, 812–820
- Salvador, C., Martinez, M., Mora, S. I., Egido, W., Farias, J. M., Gamba, G., and Escobar, L. I. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 135–147
- Attali, B., Guillemare, E., Lesage, F., Honoré, E., Romey, G., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1993) *Nature* **365**, 850–852
- Ben-Efraim, I., Shai, Y., and Attali, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8768–8771
- Morrison, B. W., Moorman, J. R., Kowdley, G. C., Kobayashi, Y. M., Jones, I. R., and Leder, P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2176–2182
- Sha, Q., Lansbery, K. L., Distefano, D., Mercer, R. W., and Nichols, C. G. (2001) *J. Physiol.* **535**, 407–417
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4183–4187
- Chavez, R. A., Gray, A. T., Zhao, B. B., Kindler, C. H., Mazurek, M. J., Mehta, Y., Forsayeth, J. R., and Yost, C. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7887–7892
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 5464–5471
- Chapman, M. I., Krovetz, H. S., and VanDongen, A. M. (2001) *J. Physiol.* **530**, 21–33
- Nichols, C. G., and Lopatin, A. N. (1997) *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 171–191

SECCIÓN III

Discusión y Perspectivas

Kluyveromyces lactis es una especie de levadura que está relacionada con *S. cerevisiae*. *K. lactis* es, aparentemente, menos compleja desde el punto de vista genético ya que sus genes se encuentran en una copia y por tanto su manipulación genética es más sencilla. Como antecedente de nuestros resultados, el grupo de Brunner y colaboradores, aislaron en 1982, unas mutantes deficientes en el transporte de potasio [Brunner 1982] Estas mutantes fueron utilizadas por Miranda y colaboradores para la clonación y caracterización de la H^+ ATPasa de esta levadura [Miranda 1997] Las mutaciones que disminuyen la actividad de la H^+ ATPasa sirvieron para demostrar que existe una relación entre el potencial de membrana generado por la H^+ ATPasa y los sistemas de transporte

En parte del trabajo de esta tesis, se describe la clonación y caracterización de un gen que codifica para un transportador del tipo TRK en *K. lactis* (K1TRK1, por ser el primer gen clonado en esta especie). Debemos aclarar que, el estudio molecular demostró que esta levadura tiene sólo un sistema de transporte de potasio y no dos como lo propusimos originalmente. El gen que codifica para el K1TRK1 tiene una mayor identidad y similitud con TRK2 *S. cerevisiae*. Por otra parte, el estudio cinético del transporte demuestra que funciona como un sistema de baja afinidad para el transporte de potasio similar al TRK2 de *S. cerevisiae*.

El gen K1TRK1 tiene una gran similitud con los genes de los transportadores homólogos clonados en otros hongos. Esto habla del nivel de homología de las secuencias y de la especificidad de estas proteínas y función en el transporte de potasio.

Por otra parte, la mutante de este transportador produce un fenotipo deficiente en el transporte de potasio. Esta característica pone de manifiesto que *K. lactis* no cuenta con otra proteína involucrada en el movimiento de potasio al interior celular. Esto es interesante, ya que uno de los puntos más discutidos en la redundancia de los sistemas de transporte de potasio en *S. cerevisiae*. Los experimentos cinéticos indican que en la cepa silvestre sólo expresa un sistema para introducir dicho ión. Por lo anterior, se puede proponer que *K. lactis* no tiene una redundancia genética para los transportadores y que K1TRK1 es la principal proteína involucrada en el transporte del potasio. Por ello *K. lactis* es un buen modelo para estudiar los sistemas de transporte de potasio.

Un aspecto importante que debemos de resaltar es que K1TRK1 es capaz de complementar heterológamente la doble mutante $\Delta trk1$, $\Delta trk2$ de *S. cerevisiae*. Esto pone de manifiesto el carácter redundante presente en los transportadores de *S. cerevisiae*. Sin embargo, aún no descartamos la posibilidad de que los sistemas de transporte de potasio en la levadura sean más complejos, y que involucren otro tipo de proteínas que sean inducibles bajo condiciones de estrés osmótico, o bien proteínas que incrementan su actividad, compensando la ausencia de otras. En la siguiente parte de resultados, se presenta experimentos en los que se demuestra que un canal rectificador de salida de

Finalmente, debemos indicar las metas siguientes para esclarecer algunas de las incógnitas que prevalecen en el campo de los transportadores y que nos interesan:

Sería notable encontrar y estudiar el o los dominios estructurales involucrados en la captura y transporte de los iones potasio en esta familia de transportadores presentes en la levadura. En el artículo sobre el transportador K1TRK1 mencionamos que existe el dominio conservado GLX ó GFX que recuerda el filtro de selectividad presente en los canales de potasio (GYG). Esta secuencia en los transportadores clonados puede estar relacionada con la selectividad del potasio por parte del transportador. Consideramos que la mutagénesis dirigida en residuos involucrados en el reconocimiento del potasio, podría darnos información de la selectividad por dicho ión.

Otro aspecto que nos interesa estudiar es si existen proteínas involucradas en el transporte de potasio. Para lograr esta meta, se pretende hacer estudios de regulación de la expresión de los genes que participan en el transporte de potasio, utilizando las metodologías de la genética molecular, como los microarreglos, para determinar si hay otros elementos genéticos aún no considerados para estos sistemas de transporte.

A partir de la clonación y caracterización del canal TOK1 de la levadura *S. cerevisiae* [Ketchum, 1995] han surgido preguntas a cerca de la funcionalidad de los dominios del poro y sobre la contribución de cada uno de ellos en la selectividad y la permeabilidad del potasio. Por otra parte, aún se especula sobre la función de este canal en la levadura. La hipótesis más aceptada en la actualidad es que el canal tiene como principal papel mantener el voltaje de la membrana plasmática durante el transporte de nutrientes [Bertl, 1998].

Los resultados que describimos indican que cada dominio de poro puede formar un canal funcional en la levadura *S. cerevisiae*, en ovocitos de *Xenopus*, así como en células de mamífero CHO y HEK, revelando propiedades novedosas en cuanto a la apertura y cierre de los canales (*gating*), la farmacología y la selectividad.

La expresión de los canales TOK1A ó TOK1B en *S. cerevisiae*, son capaces de curar el fenotipo de la mutante $\Delta trk1 \Delta trk 2$. Esta mutante de levadura ha sido utilizada con anterioridad por otros grupos como cepa receptora para clonar los canales de potasio [ORK1 *D. melanogaster* [Goldstein, 1996]; KAT1 de *A. thaliana* [Anderson, 1992] y en todos los casos se han obtenido resultados similares a los nuestros.

Los estudios realizados en ovocitos nos permitieron determinar que tanto TOK1A como TOK1B generan corrientes catiónicas no selectivas que son activadas por una hiperpolarización, a diferencia de las que genera TOK1 que son activadas con voltajes despolarizantes. Un estudio de la cinética de activación de TOK1A y de TOK1B mostró que ambos tienen tiempos de activación diferentes, lo que los hace potencialmente diferentes entre si. Por otra parte, determinamos que los canales generados tienen una activación que es dependiente del pH extracelular, como lo reportaron antes para KAT1 [Nakamura, 1997]. Es decir, a pH ácido (pH5) se activan las corrientes más grandes y rápidas mientras que a pH alcalino (pH7) la activación y el tamaño de la corriente caen de manera significativa. Estos resultados se encuentran en relación con la naturaleza de la levadura, que durante su proceso de fermentación presentan una clara tendencia a acidificar el medio extracelular (hasta un pH de 4) debido a la actividad de la H^+ ATPasa.

A un pH ácido el canal TOK1 es capaz de generar un pequeño componente de entrada que es suficiente para complementar la deficiencia que presenta la doble mutante $\Delta trk1 \Delta trk 2$. Anteriormente este fenotipo sólo había sido complementado por una sobreexpresión de dicho canal [Fairman, 1999].

Con la partición de TOK1, estamos desenmascarando un fenotipo que depende de manera importante del pH extracelular y que genera grandes corrientes catiónicas no selectivas, capaces de complementar el fenotipo de la doble mutante $\Delta trk1 \Delta trk 2$. Estamos proponiendo que las corrientes, generadas como producto de la expresión de TOK1A y TOK1B, se deben a que estos canales se acoplan en tetrámeros y no en dímeros como sucede en el canal silvestre.

Otro hallazgo es que, al co-expresar en ovocitos TOK1A y TOK1B (TOK1AB) en concentraciones equimolares, recuperamos el fenotipo de TOK1. Es decir, que la

traducción de ambos mRNAs en el citoplasma del ovocito generan los péptidos que se fusionan y en la membrana plasmática y regeneran el fenotipo de TOK1. En los experimentos de co-expresión, siempre obtuvimos una fracción de la corriente que se activa con la hiperpolarización y que es producto de los canales IOK1A y IOK1B no fusionados y otra fracción de corriente de TOK1 con fenotipo silvestre.

Partiendo del hecho de que TOK1 se bloquea por TEA mientras que IOK1A y IOK1B no se bloquean con este fármaco, y TOK1AB recupera la sensibilidad a TEA (con una K_i similar a la reportada para TOK1). Es decir, la farmacología apoya una reconstrucción del canal, ya que la fracción de corriente producto de IOK1A y IOK1B (canales no fusionados) no se bloquea.

Una conclusión preliminar puede ser que la arquitectura de los canales con dos dominios de poro sea diferente a la de los canales con un sólo dominio y que la interacción de TEA en la boca del canal dependa de factores diferentes a los que se han reportado. [Molina et al 1997]

Mediante los estudios de canal único realizados en ovocitos, determinamos que tanto IOK1A como IOK1B son diferentes. Ambos canales tienen conductancias diferentes, 7 y 15 pS respectivamente, mientras que TOK1 tiene una de 35 pS. A partir de los registros de canal único reconstruimos la corriente macroscópica obteniéndose cinéticas similares a los obtenidos por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.

Sin lugar a dudas, consideramos que el trabajo descrito con anterioridad abre grandes expectativas en el campo de los canales iónicos. El hecho de partir en dos un canal de potasio y expresar por separados ambos fragmentos y descubrir que tienen propiedades funcionales diferentes a las del canal silvestre, nos permite proponer algunos estudios estructurales y biofísicos para entender procesos tan importantes como la selectividad iónica en los canales de dos poros en tándem, que a nuestro criterio son diferentes a lo propuesto para los canales de un solo dominio de poro.

Para abordar este tema, en la actualidad nos encontramos haciendo los siguientes estudios para determinar que mecanismos regulan la selectividad iónica en los canales de dos dominios de poro.

TOK1A y TOK1B son canales catiónicos no selectivos

Hemos demostrado que ambos canales generados *in vitro* a partir del silvestre, no son selectivos para el potasio. Pensamos que la separación de los dominios de poro modifica una simetría que determina la selectividad por potasio y la sensibilidad a TEA. Los estudios cristalográficos realizados por el grupo de MacKinnon [Doyle, 1998; Morais-Cabral, 2001], en los cuales se propone que la selectividad por el potasio en el canal KcsA, mantiene una relación estructural entre los aminoácidos que conforman la región del poro y sobre todo el filtro de selectividad, el cual permite diferenciar entre

iones K^+ y Na^+ (con radios de Pauling de 1.33 Å y 0.95 Å respectivamente) una vez estructurado en tetrámeros

Una característica del filtro de selectividad (*signature sequence*) es la secuencia **GYG**, que está conservada en los canales de potasio. Se ha propuesto, que al menos en KcsA, la tirosina 78 del filtro de selectividad interacciona con el triptofano 68 que está localizado en la vecindad del poro. Dicha interacción se da entre los aminoácidos de monómeros adyacentes, lo cual proporcionara una simetría y una estabilidad tal que permite la selectividad por potasio en la región de poro.

En cambio, en los canales de dos poros no existen triptofanos en esa posición, por lo que la selectividad se debe a otras interacciones diferentes a las propuestas para los canales de un solo dominio de poro. Nosotros abordamos el tema de la estructura de los canales de dos poros en tándem, modelando y minimizando las estructuras con base en el cristal del canal KcsA de *Streptomyces lividans*. Estos resultados revelan propiedades novedosas en la arquitectura y simetría del poro de los canales con dos dominios de poro. En primer lugar podemos señalar que las secuencias de los canales que se han identificado, ninguno presenta triptofanos en la vecindad del poro y en ves de ellos hay tirosinas y fenilalaninas próximas al filtro de selectividad, el cual alterna tirosinas o fenilalaninas o leucinas en los filtros de selectividad 1 y 2 (Tabla 2).

Los canales con dos dominios de poro se asocian en dímeros [Lesage, 2000]. Pensamos que al partir TOK1 (TOK1= 2 GLG + 2 GYG) y generar TOK1A y TOK1B, que presentan cada uno de ellos una sola región formadora de poro, la dimerización se pierde y se producen canales que se acoplan en homotetrámeros con filtros de selectividad idénticos: TOK1A= 4 (GLG) y TOK1B=4 (GYG). Esto traería como una consecuencia la pérdida de la selectividad, ya que la simetría del poro de TOK1 es diferente a las que se generan en los homotetrámeros de TOK1A y TOK1B.

Proponemos que los canales generados en este estudio, potencialmente pueden regenerar una selectividad por potasio si sustituimos por mutación algunos de los residuos involucrados en la selectividad por éste (basándonos en los trabajos de del cristal de KcsA) y crear *in vitro*, canales altamente selectivos como se encuentran en la naturaleza los canales con un solo dominio de poro (Figura 2).

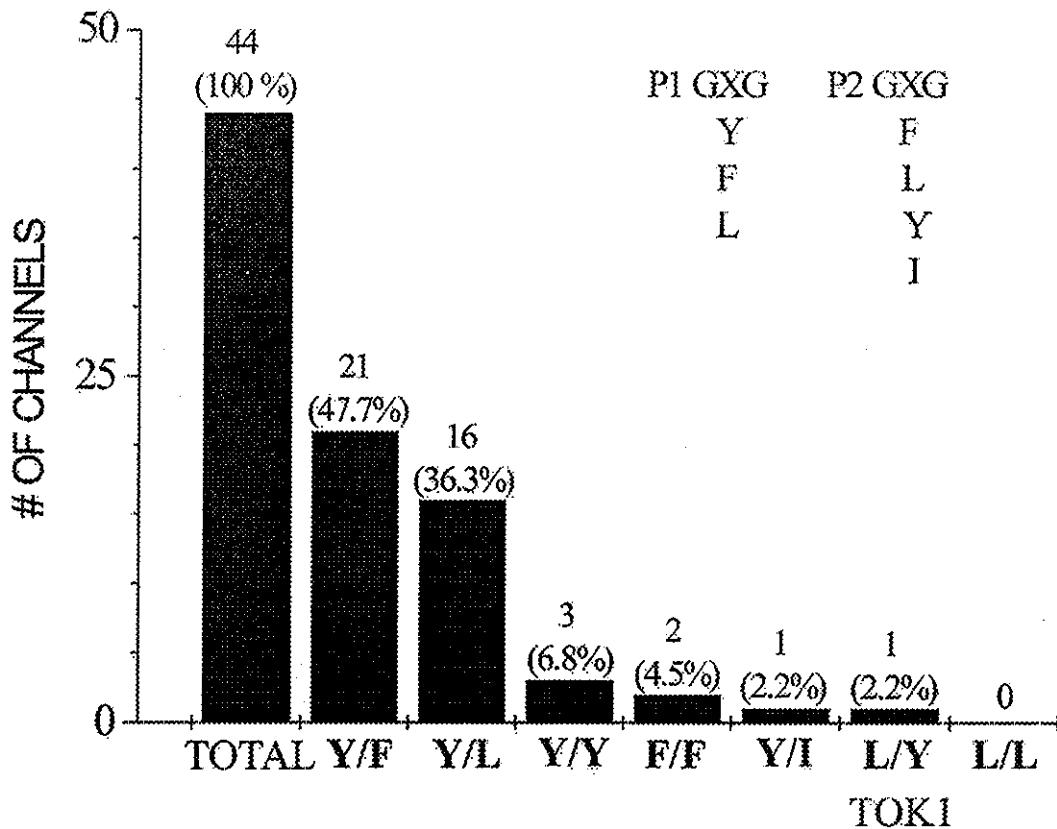
P-region I

P-region II

	G Y G X										G X G D																															
KcsA	P	R	A	L	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	P	R	A	L	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P		
Drk1	P	A	S	F	W	W	A	T	I	T	M	T	T	V	G	Y	G	D	I	Y	P	P	A	S	F	W	W	A	T	I	T	M	T	T	V	G	Y	G	D	I	Y	P
TWIK-1	T	S	A	L	F	F	A	S	T	V	L	S	T	T	G	Y	G	H	T	V	P	L	E	S	F	Y	F	C	F	I	S	L	S	T	I	G	L	G	D	Y	V	P
TWIK-2	A	S	A	L	F	F	A	S	T	L	I	T	T	V	G	Y	G	Y	T	T	P	L	D	A	F	Y	F	C	F	I	S	L	S	T	I	G	L	G	D	Y	V	P
TASK-1	A	G	S	F	Y	F	A	I	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	H	A	A	P	F	O	A	Y	Y	C	F	I	T	L	T	T	I	G	F	G	D	Y	V	A	
TASK-2	P	N	A	M	I	F	A	A	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	N	V	A	P	I	E	G	L	Y	Y	S	F	I	T	I	S	T	I	G	F	G	D	F	V	A
TASK-3	P	N	A	F	Y	F	A	I	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	H	A	A	P	F	H	A	Y	Y	C	F	I	T	L	T	T	I	G	F	G	D	F	V	A	
TREK-1	G	S	S	F	F	F	A	G	T	V	I	T	T	I	G	F	G	N	I	S	P	L	D	A	I	Y	F	V	V	I	T	L	T	T	I	G	F	G	D	Y	V	A
TRAAK	G	S	A	F	F	F	S	G	T	I	I	T	T	I	G	Y	G	N	I	V	L	L	E	A	I	Y	F	V	I	V	T	L	T	T	V	G	F	G	D	Y	V	P
ORK1	Y	H	A	F	F	F	A	F	T	V	C	S	T	V	G	Y	G	N	I	S	P	S	I	S	L	Y	S	Y	V	T	T	T	T	I	G	F	G	D	Y	V	P	
twk-1	Y	E	V	V	F	F	E	F	I	T	I	S	T	I	G	Y	G	N	Q	Y	P	I	D	D	C	Y	F	S	F	I	S	F	A	T	V	G	F	G	D	I	V	P
twk-2	L	G	S	I	F	Y	C	M	T	V	Y	T	T	I	G	Y	G	N	I	V	P	G	T	S	L	Y	F	T	L	I	S	F	T	T	I	G	F	G	D	I	V	P
twk-3	S	S	A	T	F	Y	S	M	T	L	F	S	T	I	G	Y	G	T	I	S	C	F	D	A	F	Y	F	T	F	I	S	L	T	T	I	G	L	G	D	V	M	P
twk-4	A	G	A	F	Y	F	A	T	V	V	I	T	T	V	G	Y	G	H	S	A	P	F	D	A	Y	F	F	C	M	I	S	T	T	I	G	F	G	D	L	V	P	
twk-5	G	K	A	I	F	F	S	W	T	L	Y	S	T	V	G	Y	G	S	L	Y	P	L	S	S	V	Y	F	G	I	T	M	F	L	I	G	I	G	D	I	V	P	
twk-6	P	S	S	V	L	F	S	F	T	I	L	T	T	I	G	Y	G	N	V	T	P	F	D	S	V	Y	F	S	Y	M	S	L	T	T	I	G	L	G	D	I	V	P
twk-7	L	D	R	A	L	F	C	I	T	T	I	S	T	I	G	Y	G	N	I	A	P	G	A	L	I	F	S	L	F	I	S	I	T	T	I	G	Y	G	D	Y	S	P
twk-8	S	S	S	I	F	F	A	V	T	V	V	T	T	I	G	Y	G	N	P	V	P	F	T	S	F	Y	W	S	F	I	T	M	T	T	V	G	F	G	D	I	V	P
twk-9	T	G	A	M	F	F	A	T	V	V	T	T	I	G	Y	G	Y	P	T	T	S	S	A	V	Y	F	F	I	V	S	I	S	T	V	G	L	G	D	M	L	F	
twk-10	N	L	G	K	S	Y	T	S	I	L	I	F	S	G	Y	G	I	D	A	P	M	D	G	F	Y	F	V	M	M	S	V	L	T	I	G	F	G	D	L	V	P	
twk-11	W	G	G	V	Y	Y	S	A	S	L	Y	T	T	I	G	Y	G	N	F	H	P	F	T	A	F	Y	F	F	F	T	S	L	T	T	I	G	L	G	D	V	V	T
twk-12	L	G	S	L	F	F	S	A	T	V	I	S	T	I	G	F	G	T	S	T	P	I	D	S	L	Y	F	C	F	I	S	F	A	T	I	G	F	G	D	Y	V	S
twk-13	G	S	A	F	F	F	S	M	N	V	Y	T	T	T	G	Y	G	S	I	A	P	F	H	A	F	Y	F	S	F	I	S	M	S	T	I	G	L	G	D	V	M	P
twk-14	S	S	A	L	V	F	T	T	T	T	V	I	P	V	G	Y	G	Y	I	F	P	L	D	S	V	Y	F	S	L	T	S	I	F	T	I	G	F	G	D	L	T	P
twk-15	M	S	S	I	F	F	S	W	T	A	I	T	T	I	G	Y	G	H	I	V	P	F	E	A	F	Y	F	O	F	V	T	V	T	T	I	G	F	G	D	I	V	P
twk-16	W	N	S	V	F	F	S	A	T	I	F	T	T	I	G	Y	G	N	L	A	C	L	T	A	F	Y	F	F	V	S	L	S	T	I	G	F	G	D	I	L	P	
twk-18	P	T	A	I	L	Y	V	L	T	V	L	T	T	C	G	Y	G	E	V	S	V	J	H	A	F	H	F	G	F	N	L	I	V	T	V	G	L	G	D	I	V	P
twk-19	M	S	A	M	Y	F	A	G	T	L	F	T	T	I	G	Y	G	O	I	A	C	G	Q	S	O	Y	F	M	F	I	S	L	S	T	I	G	L	G	D	V	S	V
twk-20	I	L	S	A	I	F	F	T	T	V	L	T	S	I	G	Y	G	N	L	I	P	L	D	S	F	Y	F	C	L	V	S	L	L	T	V	G	F	G	D	K	V	P
twk-21	G	N	S	V	I	F	A	F	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	H	V	A	P	F	K	A	L	Y	F	N	F	V	T	L	T	T	I	G	L	G	D	F	V	P
twk-23	S	G	A	F	Y	F	A	T	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	H	S	T	P	F	D	A	V	Y	C	F	V	T	L	T	T	I	G	F	G	D	Y	V	A	
twk-24	D	S	S	L	L	F	T	A	T	T	I	P	V	G	Y	G	Y	I	A	P	I	E	G	V	Y	F	S	T	I	T	I	F	T	I	G	F	G	D	I	T	P	
C24H11.8	S	G	A	L	L	Y	S	I	T	V	F	T	T	I	G	Y	G	H	I	C	P	F	D	G	A	Y	C	F	I	T	L	S	T	I	G	F	G	D	I	V	P	
C48E7.9	L	D	G	L	A	Y	V	I	T	C	I	T	T	I	G	Y	G	E	L	V	C	Y	D	A	L	Y	F	S	F	S	T	E	S	T	I	G	F	G	D	F	V	P
F20A1.7	W	M	S	F	L	Y	A	G	T	I	F	T	T	I	G	Y	G	N	I	A	C	F	T	S	F	Y	F	C	F	I	S	L	T	T	I	G	L	G	D	V	T	P
F31D4.7	W	N	A	V	L	F	A	G	T	I	C	T	T	I	G	Y	G	H	I	Y	P	L	E	S	F	Y	F	F	T	S	L	S	T	V	G	L	G	D	L	V	P	
F32H5.2	T	D	A	I	L	F	C	F	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	N	V	A	P	G	L	A	I	Y	F	N	F	V	T	L	T	T	I	G	L	G	D	L	V	P
F36A2.4	A	N	S	V	F	F	T	T	M	L	T	S	I	G	Y	G	Y	V	A	P	V	E	S	L	Y	F	I	F	I	S	I	L	T	V	G	F	G	D	I	R	P	
F39B6.F	G	Q	A	F	F	F	A	G	T	L	I	S	T	V	G	Y	G	R	V	S	P	L	D	A	F	Y	C	F	V	S	L	T	T	I	G	L	G	D	F	E	P	
F46A9.3	K	S	A	A	L	Y	S	L	G	I	L	T	T	L	G	Y	G	K	I	E	P	F	N	G	I	Y	A	F	I	C	L	T	A	I	E	Y	F	G	D	I	P	
T12C9.8	S	S	A	L	F	F	A	A	T	T	M	A	T	I	G	Y	G	N	I	V	P	M	D	A	F	Y	Y	S	F	I	S	L	T	T	I	G	F	G	D	I	V	P
T28A8.1	M	T	A	L	F	F	T	T	L	L	T	T	I	G	Y	G	N	L	T	P	F	S	G	F	Y	F	S	F	I	T	M	T	T	V	G	F	G	D	L	H	P	
W06D12.2	W	G	G	L	Y	Y	A	G	T	I	Y	T	T	I	G	Y	G	D	L	A	A	F	E	S	V	Y	F	F	F	I	S	M	T	T	I	G	F	G	D	F	T	P
Y37A1B.11	M	D	S	L	L	F	A	F	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	N	V	A	P	F	K	A	V	Y	F	N	F	V	T	L	T	S	I	G	L	G	D	I	V	P
Y47B3B.5	W	G	A	L	F	Y	V	G	T	L	F	T	T	I	G	Y	G	N	I	Y	P	F	T	S	L	Y	F	F	C	I	S	L	L	T	I	G	L	G	D	I	V	P
Y71H9A.1	W	N	A	M	F	L	A	V	T	T	Y	T	T	I	G	Y	G	N	I	T	A	F	K	S	F	Y	F	F	C	S	L	T	T	I	G	Y	G	D	V	T	P	
consensus	S	S	S	L	F	F	S	S	S	L	L	S	S	L	G	Y	G	-	L	S	T	F	E	S	L	F	F	S	F	I	S	L	S	S	I	G	-	G	D	L	V	P
	T	T	A	I	Y	Y	T	T	T	I	I	T	T	I	F				I	T	A	Y	D	A	I	Y	Y	T	Y	V	T	I	T	T	V				I	M		
	A	A		V	W	W	A		V	V	A		V						V	A	P	R		V	W	W	A		M	V	A	A							V			
	P			M							M											K								M											M	
																						H																				

Tabla 2. Secuencias conservadas de las regiones P de los canales de potasio. KcsA de batería y Drk1 de roedor, ambos con un dominio P; TWIK-1 y 2, TREK-1, TASK-1,2 y 3, y TRAAK de humano; ORK-1 de *Drosophila*; y 36 genes homólogos clonados del genoma de *C. elegans*, todos con 2 dominios de poro. El corchete delimita los canales mejor caracterizados. Las cajas negras muestran los residuos conservados y en la parte inferior de la tabla los residuos consenso. Las flechas indican el residuo central del filtro de selectividad.

	↔																			
KCSA	W	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	<u>Y</u>	G	D	L	Y	P	V	T	L
SHAKER	W	W	A	V	V	T	M	T	T	V	G	<u>Y</u>	G	D	M	T	P	V	G	F
TOKA	Y	F	C	T	V	S	L	L	T	V	G	L	G	D	I	L	P	K	S	V
TOKB	Y	F	C	F	L	C	L	L	T	I	G	<u>Y</u>	G	D	Y	A	P	R	T	G
TWIK1	Y	F	C	F	I	S	L	S	T	I	G	L	G	D	Y	V	P	G	E	G
TWIK2	F	F	A	S	T	V	L	S	T	T	G	<u>Y</u>	G	H	T	V	P	L	S	D



P1 GXG	P2 GXG
Y	F
F	L
L	Y
	I

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig2. Alineamiento de la secuencia de poro de algunos canales de potasio de uno y dos dominios de poro. Residuos variables en el filtro de selectividad en los canales de dos dominios de poro KcsA y Shaker son canales altamente selectivos para el potasio y se agrupan en tetrámeros mientras que TOKA, TOKB, TWIK1 y TWIK2 corresponden a las regiones de poro de los canales TOK1 y TWIK1 respectivamente. Con las flechas se muestra los residuos que interactúan (W-Y) para dar selectividad para potasio en KcsA y Shaker. TOKA, TOKB, TWIK1 y TWIK2 muestran una probable interacción entre F-L y F-Y para seleccionar potasio. B muestra una relación entre el número de canales clonados con dos dominios de poro y los residuos variables en el filtro de selectividad. La proporción de canales que alternan Y en el primer poro y F en el segundo es mayoritaria, es decir, una tirosina y otro aromático, mientras que en el caso opuesto, dos no aromáticos hasta el momento son inexistentes.

Por otra parte, pretendemos abordar el tema de la dimerización en los canales de dos dominios de poro. En algunos de los miembros de la familia KCNK (2P/4TM) se ha identificado un dominio de dimerización conocido como SID (*self-interacting domain*), que parece ser una región importante pues, al eliminarla, no se registra actividad de canal. El dominio SID se encuentra localizado entre la región M1 y P1 y no tiene similitud con las secuencias homologas de los canales 1P/2TM o 1P/6TM. En estos últimos, se sabe que el dominio de tetramerización (T1), impide la formación de heterotetrámeros. De igual manera se ha determinado que la eliminación del T1 produce canales funcionales aunque con propiedades de inactivación distintas [Zerangue, 2000].

La región SID comprende 44 residuos de aminoácidos formando una hélice anfipática, que alterna residuos cargados con residuos no polares. Al alinear los canales KCNK revelan una cisteína conservada en la posición 69, la cual se ha propuesto como parte fundamental del dominio de dimerización por su capacidad de formar puentes disulfuro entre las cadenas [Lesage, 2000]. Sin embargo, se ha visto que el dominio SID es muy variable en esta familia de canales y se cuestiona si realmente juega un papel importante en la dimerización, ya que pudiera ser una región que una ligandos extracelulares que regulen la actividad de los canales. Por lo tanto, su eliminación impediría que los canales tuvieran la capacidad de activarse.

Consideramos que una buena aproximación para determinar la funcionalidad de los canales con dos dominios de poro puede ser la clonación en tándem de monómeros de canales. Es decir, la clonación consecutiva de dos veces la secuencias (eliminando previamente el codón de termino del primero) de TOK1. Lo que se espera de esta construcción es que la expresión sea suficiente para que un canal se forme como un dímero. Mediante técnicas electrofisiológicas se podrá comparar la expresión del canal silvestre y el dímero construido. Proponemos que la expresión de canales por esta vía, conducirá a la formación de canales sin la necesidad de dominios de dimerización, al plegarse sobre sí mismo. Esta estructura tendría incluido los cuatro dominios estructurales de poro que serían necesarios.

TOK1, TOK1A y TOK1B muestran sensibilidad a pH extracelular

En el trabajo que presentamos, mostramos el papel que desempeña el pH extracelular. Demostramos que tanto en el canal silvestre como a los generados *in vitro*, la corriente de entrada se incrementa al acidificar el medio extracelular, principalmente en TOK1A y TOK1B, mientras que en TOK1 sólo es perceptible a pH de 5. Este resultado lo hemos relacionado con la biología de la levadura que durante la fermentación, el medio extracelular alcanza un pH hasta de 4.0. Esto favorece la actividad de estos canales que complementan eficientemente la doble mutante ($\Delta trk1$, $\Delta trk2$) de levadura.

Nosotros hemos comparado que tanto *S. cerevisiae* y ovocitos de *Xenopus*, son sistemas donde podemos hacer modificaciones del pH extracelular y estudiar el efecto sobre la actividad de los canales. A partir de estos estudios nosotros sugerimos que los

canales pueden tener aminoácidos involucrados en la detección de cambios en la acidez del medio extracelular, a manera de un sensor de pH.

Se han propuesto probables sensores del pH en los canales KAT1 [Nakamura, 1997 #36], ROMK1 [Chanchevalap, 2000], Kir 5.1 [Tucker, 2000], que responden a los cambios en la acidez intracelular. Estos estudios han dado pauta para proponer que la sensibilidad intracelular a pH, es un causa de rectificación en los canales rectificadores de entrada y como una alternativa a otros mecanismos ya propuestos (Mg^{2+} y poliaminas). Por otra parte se ha publicado que TOK1 se inactiva por un decremento de pH intracelular en un pK_a de 6.5 [Lesage, 1996]. Este fenómeno se ha propuesto como un mecanismo de rectificación de salida en este canal.

TASK-1 (KCNK3) es un canal que se inhibe por protones extracelulares a un pH fisiológico [Lopes, 2000]. TASK-3 es un canal que se expresa exclusivamente en el cerebro del mamífero. Cuando se expresa en células HEK293 en la configuración de canal único, genera una corriente rectificadora de entrada y la probabilidad de apertura se incrementa notablemente con voltajes despolarizantes y con la eliminación de los cationes divalentes del medio extracelular. Los estudios en ovocitos de *Xenopus* revelaron que las corrientes rectificadoras de salida decrecen a UN pH extracelular bajo. La sustitución de la His-98 por una asparagina o por tirosina abate la sensibilidad al pH [Rajan, 2000]. Lo notable de estos resultados es que señalan a esta histidina como la responsable de la sensibilidad al pH. Dicha histidina se encuentra adyacente al filtro de selectividad.

A continuación se muestra la secuencia de poro de los canales que tienen dos dominios de poros en tándem, los cuales son los candidatos principales para estudiar la sensibilidad a pH.

KAT1	T	A	L	Y	W	S	I	T	T	L	T	T	T	G	Y	G	D	F
AKT1	T	S	M	Y	W	S	I	T	T	L	T	T	V	G	Y	G	D	L
SHAKER	D	A	F	W	W	A	V	V	T	M	T	T	V	G	Y	G	D	M
TASK-3 (P1)	N	A	M	I	F	A	A	T	V	I	T	T	I	G	Y	G	H	A
TASK-3 (P2)	H	A	Y	Y	Y	C	F	I	T	L	T	T	I	G	F	G	D	F
TREK-1 (P1)	S	S	F	F	F	A	G	T	V	I	T	T	I	G	F	G	N	I
TREK-1 (P2)	D	A	I	Y	F	V	V	I	T	L	T	T	I	G	F	G	D	Y
TRAAK (P1)	S	A	F	F	F	S	G	T	I	I	T	T	I	G	Y	G	N	I
TRAAK (P2)	E	A	I	Y	F	V	I	V	T	L	T	T	V	G	F	G	D	Y
TWIK-1 (P1)	S	A	L	F	F	A	S	T	V	L	S	T	T	G	Y	G	H	T
TWIK-1 (P2)	E	S	F	Y	F	C	F	I	S	L	S	T	I	G	L	G	D	Y
TOK-1 (P1)	N	A	L	Y	F	C	T	V	S	L	L	T	V	G	L	G	D	I
TOK-1 (P2)	N	C	I	Y	F	C	F	L	C	L	L	T	I	G	Y	G	D	Y

D
 Consenso H
 N

De esta tabla podemos indicar que hay un consenso en la posición adyacente al filtro de selectividad y que ahí se encuentran residuos con diferente pK_a en la cadena lateral. La facilidad que presentan estos residuos para ionizarse al modificar el pH extracelular, pone de manifiesto que en esta región se puede localizar un sensor de pH.

Para el caso de TOK1, proponemos que en esta región se encuentra una parte que es capaz de responder al pH extracelular y que se detecta sobre todo al partir el canal y generar TOK1A y TOK1B. Por esta razón, la modificación de estos residuos nos permitirá determinar como los canales generados en este estudio pueden responder al pH externo

Finalmente consideramos que hay una gama de posibilidades a estudiar a partir de los canales generados en este estudio, quedando aún algunas preguntas por contestar y cuya explicación cae mas en un terreno especulativo: ¿Cuál es el papel funcional del canal TOK1 en la levadura? ¿Qué relevancia tiene el hecho que hasta el momento TOK1 sea el único canal clonado que presente 8 cruces transmembranales?

En cuanto a la primera pregunta, la explicación más aceptada es la de un balance de cargas durante el transporte de nutrientes al interior celular. Sin embargo, algunos estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que tal vez este canal pudiera tener un papel en la regulación del volumen celular. Hasta el momento nos preguntamos que tan factible puede ser esto ya que la levadura, como muchos hongos, han mostrado que gran parte de los problemas de tonicidad celular la solucionan a través de la presencia de la pared celular, sin lugar a duda una estructura importante que protege a la célula de los cambios fuertes de osmolaridad. Pero queda abierta la posibilidad de que TOK1 sea una proteína que regule el volumen, y que en realidad, la levadura no es un sistema idóneo para estudiar este evento natural debido a las restricciones físicas que representa la pared celular.

La segunda pregunta puede tener más una explicación evolutiva si planteamos que TOK1 es el ancestro común y que por divergencia evolutiva se generaron las familias 1P/6TM y 1P/2TM que se encuentran distribuidas ampliamente en los diferentes reinos. Sin embargo en las bacterias se encuentran canales pertenecientes a la familia 1P/2TM, y que son evolutivamente más antiguas que el resto de los organismos unicelulares y pluricelulares. Por esta razón pensamos que los canales generados *in vitro* en este estudio, pueden dar una explicación de cómo los canales pudieron divergir o converger y que presiones ambientales tuvieron que suscitarse para que la separación o fusión de genes se concretara.

TOK1 ha demostrado ser un buen modelo para estudiar algunos aspectos básicos de los canales iónicos tales como la conducción, permeación y selectividad iónica, así como los motivos estructurales presentes en las familias de canales. Es probable que todos los canales clonados de la familia KCNK (que presentan una estructura básica de 2P/4TM) así como los canales ortólogos en otras especies, pudieran tener un ancestro común. Pensamos que la eliminación de los primeros 4 cruces transmembranales de TOK1, que no tienen una función estructural aparente, dará como resultado un canal funcional y con propiedades cinéticas de selección iónica similares a las del canal completo, ya que los eventos importantes de selección y permeación se dan en un sitio más conservado de la proteína. Si los resultados nos muestran lo contrario estudiaremos el papel de dichos segmentos en la estabilidad del canal en la membrana.

Las propiedades estudiadas hasta ahora, demuestran que tanto TOK1A como TOK1B generan canales iónicos funcionales que complementan la mutante de levadura *Δtrk1, Δtrk2*. La permeabilidad y la selectividad en cada uno de ellos es diferente a el canal completo. Esto lo basamos en el hecho de que las corrientes generadas por cada uno de los dominios son catiónicas no selectivas activadas por hiperpolarización; es decir, se activan a voltajes muy negativos produciendo corrientes iónicas de entrada a la célula, a diferencia del canal completo TOK1 que produce corrientes de salida selectivas a potasio activadas por despolarización.

En retrospectiva, el cambio de selectividad que se observa al partir el canal TOK1, muy probablemente se debe a que en los canales con dos dominios de poro en tándem, existe una secuencia especial de aminoácidos posiblemente compartida por ambos dominios de poro y esta confiere una geometría específica de selectividad para potasio. Esto lo basamos en el hecho de que al co-expresar TOK1A y TOK1B en una misma célula, se recupera la selectividad e incluso la propiedad de rectificación saliente, principales características del canal TOK1. Los experimentos de co-expresión revelan que la reestructuración del poro se da y se recuperan las propiedades cinéticas y de selectividad.

En resumen, la partición del canal TOK1 y la expresión y caracterización de cada uno de los fragmentos por separado y en combinación, abre nuevas posibilidades para estudiar problemas de selectividad y de estructuración, aun desconocidos en las canales de potasio con dos regiones de poro en tándem.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, A , Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L , and Goldstein, S. A (1999) A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99, 283-291
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., and Slayman, C. L. (1998) Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ *J Membr Biol* 162, 67-80
- Bixby, K. A., Nanao, M. H., Shen, N. V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. J., and Choe, S. (1999) Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels *Nat Struct Biol* 6, 38-43
- Brunner, A Carrasco, N. Pena, A. Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast *Arch Biochem Biophys* 217,30-36
- Carney, G. E., and Bender, M. (2000) The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* 154, 1203-1211.
- Chung, S. Y., Han, K. S., Chung, Y. K., Chang, M. S., and Lee, M. G. (1998) Stability, blood partition, and pharmacokinetics of a new proton pump inhibitor, YJA-20379-8. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 100, 187-200.
- Cushman, S. J., Nanao, M. H., Jahng, A. W., DeRubeis, D., Choe, S., and Pfaffinger, P. J. (2000) Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure *Nat Struct Biol* 7, 403-407
- Day, M. L., Winston, N., McConnell, J. L., Cook, D., and Johnson, M. H. (2001) tiK⁺ toK⁺: an embryonic clock? *Reprod Fertil Dev* 13, 69-79
- Dennis, N. A., Blauer, H. M., and Kent, J. E. (1982) Dissolution fractions and half-times of single source yellowcake in simulated lung fluids *Health Phys* 42, 469-477.
- Fairman, C., Zhou, X., and Kung, C. (1999) Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast *J Membr Biol* 168, 149-157
- Gray, A. I., Winegar, B. D., Leonoudakis, D. J., Forsayeth, J. R., and Yost, C. S. (1998) TOK1 is a volatile anesthetic stimulated K⁺ channel *Anesthesiology* 88, 1076-1084.
- James, A. N., Knox, J. M., and Williams, R. P. (1976) Attachment of gonococci to sperm. Influence of physical and chemical factors. *Br J Vener Dis* 52, 128-135.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem *Nature* 376, 690-695.
- Kindler, C. H., Yost, C. S., and Gray, A. I. (1999) Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem *Anesthesiology* 90, 1092-1102.
- Kobertz, W. R., and Miller, C. (1999) K⁺ channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure. *Nat Struct Biol* 6, 1122-1125.
- Kobertz, W. R., Williams, C., and Miller, C. (2000) Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K(+) channel *Biochemistry* 39, 10347-10352

- Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., and Choe, S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392, 945-948.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996) A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* 271, 4183-4187.
- Liu, T. I., Lebaric, Z. N., Rosenthal, J. J., and Gilly, W. F. (2001) Natural substitutions at highly conserved T1-domain residues perturb processing and functional expression of squid Kv1 channels. *J Neurophysiol* 85, 61-71.
- Loukin, S. H., Vaillant, B., Zhou, X. L., Spalding, E. P., Kung, C., and Saimi, Y. (1997) Random mutagenesis reveals a region important for gating of the yeast K⁺ channel Ykc1. *Embo J* 16, 4817-4825.
- Loukin, S. H., and Saimi, Y. (1999) K(+)-dependent composite gating of the yeast K(+) channel, Tok1. *Biophys J* 77, 3060-3070.
- Miranda, M., Ramirez, J., Pena, A., Coria, R. Molecular cloning of the plasma membrane H(+)-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K⁺ uptake. *J Bacteriol.* 177, 2360-2367
- Molina, A., Castellano, A. G., and Lopez-Barneo, J. (1997) Pore mutations in Shaker K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J Physiol* 499, 361-367.
- Orias, M., Velazquez, H., Tung, F., Lee, G., and Desir, G. V. (1997) Cloning and localization of a double-pore K channel, KCNK1: exclusive expression in distal nephron segments. *Am J Physiol* 273, F663-666.
- Pfaffinger, P. J., and DeRubeis, D. (1995) Shaker K⁺ channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure. *J Biol Chem* 270, 28595-28600.
- Reid, J. D., Lukas, W., Shafaatian, R., Bertl, A., Scheurmann-Kettner, C., Guy, H. R., and North, R. A. (1996) The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. *Receptors Channels* 4, 51-62.
- Rios, G., Ferrando, A., and Serrano, R. (1997) Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 515-528.
- Roberts, S. K., Fischer, M., Dixon, G. K., and Sanders, D. (1999) Divalent cation block of inward currents and low-affinity K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 291-297.
- Saldana, C., Naranjo, D., Coria, R., Pena, A., and Vaca, L. (2001) Splitting the two-pore-domains from TOK1 results in two potassium channels with novel functional properties. *J Biol Chem* 19, 19.
- Salkoff, L., and Jegla, T. (1995) Surfing the DNA databases for K⁺ channels nets yet more diversity. *Neuron* 15, 489-492.
- Segal, A. S., Yao, X., and Desir, G. V. (1999) The T0 domain of rabbit KV1.3 regulates steady state channel protein level. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 54-64.
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., and Goldstein, S. A. (2001) Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell* 105, 637-644.

- Shen, N. V., and Pfaffinger, P. J. (1995) Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily- specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* 14, 625-633.
- Sokolova, O., Kolmakova-Partensky, L., and Grigorieff, N. (2001) Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure (Camb)* 9, 215-220.
- Tu, L., Wang, J., Helm, A., Skach, W. R., and Deutsch, C. (2000) Transmembrane biogenesis of Kv1.3. *Biochemistry* 39, 824-836.
- Vergani, P., Miosga, T., Jarvis, S. M., and Blatt, M. R. (1997) Extracellular K⁺ and Ba²⁺ mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K⁺ channel encoded by the yeast gene TOK1. *FEBS Lett* 405, 337-344.
- Vergani, P., Hamilton, D., Jarvis, S., and Blatt, M. R. (1998) Mutations in the pore regions of the yeast K⁺ channel YKC1 affect gating by extracellular K⁺. *Embo J* 17, 7190-7198.
- Vergani, P., and Blatt, M. R. (1999) Mutations in the yeast two pore K⁺ channel YKC1 identify functional differences between the pore domains. *FEBS Lett* 458, 285-291.
- Yao, X., Liu, W., Tian, S., Rafi, H., Segal, A. S., and Desir, G. V. (2000) Close association of the N terminus of Kv1.3 with the pore region. *J Biol Chem* 275, 10859-10863.
- Yost, C. S., Gray, A. I., Winegar, B. D., and Leonoudakis, D. (1998) Baseline K⁺ channels as targets of general anesthetics: studies of the action of volatile anesthetics on TOK1. *Toxicol Lett* 100-101, 293-300.
- Zerangue, N., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3591-3595.
- Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., and MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661.

APÉNDICE

La técnica de fijación de voltaje.

Los estudios de potencial de acción establecieron importantes conceptos sobre el movimiento de iones. Como una consecuencia se dio el desarrollo de bases cuantitativas para procedimientos experimentales y la medición de corriente iónicas (Marmont 1949; Cole 1949 y Hodgkin, Huxley y Katz 1949,1952). El método que se conoce actualmente como fijación de voltaje (*voltage-clamp*), ha sido la técnica biofísica más utilizada para el estudio de canales iónicos por mas de 50 años. La idea es sencilla, la fijación de voltaje es una medida para controlar el potencial a través de las membranas aplicando voltaje y midiendo la corriente que se produce.

Fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos (*two-electrodes voltage clamp*)

Cuando se quiere hacer fijación de voltaje en registros de célula entera, es esencial que el voltaje se fije rápidamente para asegurar un estudio adecuado de la cinética de canales. Se sabe que grandes áreas de membrana (y por lo tanto la capacitancia) como la de los ovocitos, requieren de largo tiempo (esto es relativo) para poder fijar adecuadamente el voltaje de la membrana a un potencial designado. Una forma de resolver este problema es hacer una fijación rápida de voltaje mediante el uso de dos electrodos (*two-electrode voltage clamp*, TEVC). En registros electrofisiológicos típicos con TEVC, uno de los electrodos (el electrodo de voltaje) es utilizado para registrar el potencial de membrana instantáneo en relación con la tierra del baño, y el segundo (electrodo de corriente) pasa suficiente corriente para mantener el voltaje fijado previamente. Esto se ejecuta usando un circuito de retroalimentación (*feedback circuit*) el cual es el principal componente en la fijación de voltaje. La corriente inyectada a través del electrodo de corriente mantiene el potencial que es proporcional a la corriente que fluye a través de los canales de la membrana. De este modo, es posible el registro de las corrientes que pasan por el electrodo de corriente, como una medida de la actividad del canal.

TEVC es un método de registro electrofisiológico que es bastante estable. Por ejemplo, las células en registro son capaces de tolerar cambios de la solución externa por perfusión. Esta puede ser por gravedad y con una pipeta de succión se puede regular el nivel de la solución. Por este método se puede también someter a las células en experimentación a soluciones extracelulares que contengan bloqueadores y moléculas con actividad farmacológica que puedan atravesar la membrana plasmática. Mientras se registra es posible inyectar con un electrodo intracelular segundos mensajeros o inhibidores de canales.

Los electrodos utilizados en TEVC en ovocitos están elaborados con capilares de vidrio y son llenados con una solución que contiene 1 a 3 M de KCl, eso hace que los electrodos sean capaces de mantener un contacto eléctrico entre el lado interno de la

pipeta y la solución intracelular. Típicamente el diámetro de la punta del electrodo tiene un diámetro entre 1 y 5 μm y dependiendo de la solución que se use, la resistencia varía de 0.3 a 1.0 $\text{M}\Omega$. El contacto de la solución que llena el electrodo está dada por un alambre de Ag-AgCl (electrodo de plata clorinado). Si la resistencia del electrodo no varía mucho después de hacer una serie experimental, puede ser reusado con uno o más ovocitos. Los electrodos pueden ser llenados bajo presión negativa con una jeringa. Dependiendo del tipo de experimento (con respecto a la duración del mismo), la concentración de la solución de KCl debe de variar.

La técnica de fijación de voltaje en parche (*patch clamp*)

La primera medición de canales unitarios en membranas biológicas fue hecha por Neher y Sakmann presionando pipetas de vidrio contra la superficie de músculo limpia (Sakmann & Neher 1983, Neher & Sakmann 1986). De esta forma fueron ellos los primeros en medir la corriente eléctrica que pasa a través de un receptor de acetilcolina. La relación señal a ruido mejoró en ordenes de magnitud cuando Neher y Sakmann descubrieron el "gigasello". Este se produce cuando se le aplica succión a la pipeta que está en contacto con la membrana dando origen a las diferentes modalidades de la técnica fijación de voltaje en parches o en inglés Patch Clamp.

La técnica de patch clamp requiere que la membrana a estudiar, esté limpia de tejidos adyacentes. Una pipeta de vidrio (pipeta de patch clamp) con un orificio en la punta del orden de un micrómetro de diámetro a la que se le pule la punta con calor, se acerca a la superficie celular y después de hacer contacto, se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta (sello), lo que hace que parte de la superficie de la membrana se invagine en la pipeta. Esto produce una unión entre la membrana y la superficie del vidrio aumentando significativamente la resistencia del sello del orden de megaohms (10^6) a valores entre 10 y 100 gigaohms (10^9). Este proceso permite un aislamiento perfecto entre la región de la membrana circunscrita por la pipeta del resto de la membrana haciéndose posible registrar la corriente de un canal aislado. Se debe de tener en cuenta que para hacer esta técnica electrofisiológica, el amplificador al cual estará conectada la pipeta sea de muy bajo ruido para que puedan ser distinguibles la corriente del canal unitario del ruido de fondo (Sakmann & Neher 1983).

Cuando exista un solo canal en la membrana aislada, la corriente que se mida será la corriente unitaria y que puede modificarse a voluntad si nosotros variamos el voltaje. Esta propiedad nos brinda la posibilidad de estudiar un solo canal bajo condiciones de potencial de membrana controlado a micro escala.

La técnica de patch clamp tiene la capacidad de modificarse (cambio metodológico o de conformación), de tal manera que podemos estudiar un solo canal de una manera aislada y escindida. La unión del vidrio de la pipeta; como se mencionaba con anterioridad, produce sellos de alta resistencia. Esta condición permite la posibilidad de que cuando se retira la pipeta bruscamente, se pueda aislar un fragmento de la membrana adosado a la pipeta dejando el resto de la célula atrás. En este caso, es posible aplicar una diferencia de potencial a este pedazo de membrana que se encuentra

completamente aislado e incluso se puede cambiar la solución al lado interno de la membrana. Esta configuración se le conoce con el nombre de el lado interno hacia afuera (*inside-out*). Otra posibilidad de conformación de la técnica de patch clamp es que una vez que se ha establecido el sello de alta resistencia se le aplique una fuerte succión o se aplica un potencial elevado, siendo posible romper la membrana y obtener una comunicación con el interior de la célula. Esta configuración se conoce como célula completa (*whole cell*). Si ahora se retira la pipeta es posible llevar membrana plasmática adosada a la pipeta, que al estirarse en exceso, se estrecha y finalmente se rompe quedando el exterior hacia afuera generándose la configuración exterior hacia fuera (*outside-out*).

El sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*

El uno de los objetivos de la electrofisiología es entender los mecanismos moleculares por los cuales los iones pasan a través de los canales. Particularmente como son sus mecanismos de activación y de inactivación, los de permeación y regulación. Este tipo de experimentos se ven restringidos por carecer de un modelo experimental apropiado. La mayoría de las células que se utilizan para estudios electrofisiológicos expresan una variedad de canales endógenos, lo cual dificulta el estudio por expresión heteróloga de un solo tipo de canal aislado. Este problema puede ser parcialmente resuelto utilizando soluciones que contengan bloqueadores y iones que no pasen por los canales endógenos y así aislar el canal que se exprese. Otro problema con el que se puede enfrentar es la incapacidad de modificar artificial y sistemáticamente el gen que codifica para el canal en células intactas, excluyéndose la caracterización de la estructura-función. Por lo tanto, es necesario contar con un sistema donde la célula exprese conductancias endógenas pequeñas y en el cual un canal pueda ser estudiado por sobre expresión heteróloga.

El sistema de expresión de *Xenopus* consiste en aislar células gaméticas de hembras de *X. laevis*, las cuales después de un tratamiento suave con colagenasa son inyectadas con RNAm que codifique para canales iónicos que nos interesen. Algunas de las ventajas que ofrece este sistema son:

- a) Es relativamente sencillo aislar un gran número de células viables a partir de una sola rana donadora. Estas células pueden ser removidas por cirugía sin tener que sacrificar al animal. De este modo, una sola rana puede ser usada varias veces.
- b) Las células aisladas pueden durar poco más de una semana *in vitro*. Las células pueden permitir varios empalmientos de microelectrodos y pipetas de inyección. Además, es relativamente fácil mantener las células una vez aisladas.
- c) Los ovocitos de *Xenopus* son de gran tamaño (> a 1 mm de diámetro), lo cual hace fácil su manipulación. Esto permite de manera sencilla inyectar RNAm o DNA en el núcleo, o componentes químicos dentro de la célula.
- d) Los ovocitos expresan pocos canales endógenos. Estos formarán parte como una pequeña fracción de la corriente expresada.

Los ovocitos de *Xenopus* se han utilizado para hacer la traducción *in vivo* de RNAm de proteínas asociadas con la membrana plasmática, con las modificaciones pot-

traduccionales correctas. Por su parte, las técnicas de ingeniería genética permiten, por mutagénesis dirigida, la modificación de los RNAm que codifican para proteínas relacionadas con la membrana y así poder estudiar la relación estructura-función de la proteína.

El sistema tiene sus limitaciones. Las modificaciones post-traduccionales pueden ser diferentes comparándolas con las células de mamífero, lo cual puede resultar en proteínas con propiedades alteradas. Es imposible diseñar experimentos a temperaturas más elevadas que la ambiente. Hay que recordar que *Xenopus* es un anfibio. No obstante, de estas limitaciones los ovocitos son un sistema conveniente de expresión. De hecho, solo ciertos experimentos son posibles en ovocitos.

Aislamiento de ovocitos por cirugía e inyección de RNAm

Xenopus laevis pertenece a la familia *Pipidae*. Esta especie es endémica del sureste de África y en el laboratorio puede vivir hasta 15 años. La rana es acuática y si es removida del agua por varias horas, puede morir por desecación. Hasta 15 ranas pueden estar en el mismo acuario. Los ovocitos pueden ser removidos por cirugía sin tener que sacrificar al animal. Para hacer la cirugía primero hay que seleccionar a una rana que tenga al menos 4 semanas sin que se le haya hecho cirugía. La rana es transferida a un baño que contenga un anestésico (por ejemplo, ácido 3-aminobenzoico etil ester), el cual absorberá por la piel. Alrededor de 20-30 minutos es suficiente. Una alternativa para anestesiarse a la rana es transferirla a un baño de hielo, donde el metabolismo de la rana bajara lentamente hasta alcanzar la inconciencia. Una vez anestesiada la rana, es colocada con el dorso hacia abajo en una cama de hielo donde permanecerá durante la cirugía. Se le practica una pequeña incisión abdominal subyacente a la fascia. Parte de los ovarios pueden ser sacados y se puede observar que empaqueta muchos ovocitos. Se toman algunos y el resto son regresados a la cavidad abdominal y finalmente la escisión es suturada. La rana se transfiere a un contenedor de agua libre de anestésico para su recuperación.

Los ovocitos extraídos del ovario consisten en varias células unidas por tejido conectivo. Para la inyección de RNAm y registros electrofisiológicos, es necesario aislar los ovocitos uno por uno. Posteriormente son colocados en una solución de colagenasa (1mg/ml) a temperatura ambiente por una hora aproximadamente (el tiempo dependerá de la cantidad de ovocitos que se estén tratando). Es necesario estar revisando la digestión con colagenasa, hasta que se alcance la ruptura del tejido conectivo y se encuentren los ovocitos aislados. Después del tratamiento con colagenasa, son seleccionadas bajo un microscopio las células que se encuentren sanas y se transfieren a una incubadora con una temperatura de 19° C (para la expresión óptima). Las células sanas tienen apariencia esférica lisa, con un color café oscuro homogéneo (polo animal), y uno blanco (polo vegetal).

Finalmente los ovocitos son inyectados con RNAm que codifique para la proteína que nos interese estudiar. Aproximadamente 50 nl de agua estéril que contenga entre 0.5 - 5 ng/nl, es inyectada por ovocito. Esto se hace a través de una pipeta de inyección.

controlado por un microinyector acoplado a un micromanipulador. Después de la inyección, los ovocitos son incubados por 2 a 4 días para la expresión.

Bibliografía:

-Neher E, B Sakmann 1986 single channel recorded from membranes of denervated frog muscle fibres. Nature 260: 799-802

-Sakmann B, Neher E 1983 Single-channel recording Plenum Press New York and London

APÉNDICE

La técnica de fijación de voltaje.

Los estudios de potencial de acción establecieron importantes conceptos sobre el movimiento de iones. Como una consecuencia se dio el desarrollo de bases cuantitativas para procedimientos experimentales y la medición de corriente iónicas (Marmont 1949; Cole 1949 y Hodgkin, Huxley y Katz 1949,1952). El método que se conoce actualmente como fijación de voltaje (*voltage-clamp*), ha sido la técnica biofísica más utilizada para el estudio de canales iónicos por mas de 50 años. La idea es sencilla, la fijación de voltaje es una medida para controlar el potencial a través de las membranas aplicando voltaje y midiendo la corriente que se produce.

Fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos (*two-electrodes voltage clamp*)

Cuando se quiere hacer fijación de voltaje en registros de célula entera, es esencial que el voltaje se fije rápidamente para asegurar un estudio adecuado de la cinética de canales. Se sabe que grandes áreas de membrana (y por lo tanto la capacitancia) como la de los ovocitos, requieren de largo tiempo (esto es relativo) para poder fijar adecuadamente el voltaje de la membrana a un potencial designado. Una forma de resolver este problema es hacer una fijación rápida de voltaje mediante el uso de dos electrodos (*two-electrode voltage clamp*, TEVC). En registros electrofisiológicos típicos con TEVC, uno de los electrodos (el electrodo de voltaje) es utilizado para registrar el potencial de membrana instantáneo en relación con la tierra del baño, y el segundo (electrodo de corriente) pasa suficiente corriente para mantener el voltaje fijado previamente. Esto se ejecuta usando un circuito de retroalimentación (*feedback circuit*) el cual es el principal componente en la fijación de voltaje. La corriente inyectada a través del electrodo de corriente mantiene el potencial que es proporcional a la corriente que fluye a través de los canales de la membrana. De este modo, es posible el registro de las corrientes que pasan por el electrodo de corriente, como una medida de la actividad del canal.

TEVC es un método de registro electrofisiológico que es bastante estable. Por ejemplo, las células en registro son capaces de tolerar cambios de la solución externa por perfusión. Esta puede ser por gravedad y con una pipeta de succión se puede regular el nivel de la solución. Por este método se puede también someter a las células en experimentación a soluciones extracelulares que contengan bloqueadores y moléculas con actividad farmacológica que puedan atravesar la membrana plasmática. Mientras se registra es posible inyectar con un electrodo intracelular segundos mensajeros o inhibidores de canales.

Los electrodos utilizados en TEVC en ovocitos están elaborados con capilares de vidrio y son llenados con una solución que contiene 1 a 3 M de KCl, eso hace que los electrodos sean capaces de mantener un contacto eléctrico entre el lado interno de la

pipeta y la solución intracelular. Típicamente el diámetro de la punta del electrodo tiene un diámetro entre 1 y 5 μm y dependiendo de la solución que se use, la resistencia varía de 0.3 a 1.0 $\text{M}\Omega$. El contacto de la solución que llena el electrodo está dada por un alambre de Ag-AgCl (electrodo de plata clorinado). Si la resistencia del electrodo no varía mucho después de hacer una serie experimental, puede ser reusado con uno o más ovocitos. Los electrodos pueden ser llenados bajo presión negativa con una jeringa. Dependiendo del tipo de experimento (con respecto a la duración del mismo), la concentración de la solución de KCl debe de variar.

La técnica de fijación de voltaje en parche (*patch clamp*)

La primera medición de canales unitarios en membranas biológicas fue hecha por Neher y Sakmann presionando pipetas de vidrio contra la superficie de músculo limpia (Sakmann & Neher 1983, Neher & Sakmann 1986). De esta forma fueron ellos los primeros en medir la corriente eléctrica que pasa a través de un receptor de acetilcolina. La relación señal a ruido mejoró en ordenes de magnitud cuando Neher y Sakmann descubrieron el "gigasello". Este se produce cuando se le aplica succión a la pipeta que está en contacto con la membrana dando origen a las diferentes modalidades de la técnica fijación de voltaje en parches o en inglés Patch Clamp.

La técnica de patch clamp requiere que la membrana a estudiar, esté limpia de tejidos adyacentes. Una pipeta de vidrio (pipeta de patch clamp) con un orificio en la punta del orden de un micrómetro de diámetro a la que se le pule la punta con calor, se acerca a la superficie celular y después de hacer contacto, se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta (sello), lo que hace que parte de la superficie de la membrana se invagine en la pipeta. Esto produce una unión entre la membrana y la superficie del vidrio aumentando significativamente la resistencia del sello del orden de megaohms (10^6) a valores entre 10 y 100 gigaohms (10^9). Este proceso permite un aislamiento perfecto entre la región de la membrana circunscrita por la pipeta del resto de la membrana haciéndose posible registrar la corriente de un canal aislado. Se debe tener en cuenta que para hacer esta técnica electrofisiológica, el amplificador al cual estará conectada la pipeta sea de muy bajo ruido para que puedan ser distinguibles la corriente del canal unitario del ruido de fondo (Sakmann & Neher 1983).

Cuando exista un solo canal en la membrana aislada, la corriente que se mida será la corriente unitaria y que puede modificarse a voluntad si nosotros variamos el voltaje. Esta propiedad nos brinda la posibilidad de estudiar un solo canal bajo condiciones de potencial de membrana controlado a micro escala.

La técnica de patch clamp tiene la capacidad de modificarse (cambio metodológico o de conformación), de tal manera que podemos estudiar un solo canal de una manera aislada y escindida. La unión del vidrio de la pipeta; como se mencionaba con anterioridad, produce sellos de alta resistencia. Esta condición permite la posibilidad de que cuando se retira la pipeta bruscamente, se pueda aislar un fragmento de la membrana adosado a la pipeta dejando el resto de la célula atrás. En este caso, es posible aplicar una diferencia de potencial a este pedazo de membrana que se encuentra

completamente aislado e incluso se puede cambiar la solución al lado interno de la membrana. Esta configuración se le conoce con el nombre de el lado interno hacia afuera (*inside-out*). Otra posibilidad de conformación de la técnica de patch clamp es que una vez que se ha establecido el sello de alta resistencia se le aplique una fuerte succión o se aplica un potencial elevado, siendo posible romper la membrana y obtener una comunicación con el interior de la célula. Esta configuración se conoce como célula completa (*whole cell*). Si ahora se retira la pipeta es posible llevar membrana plasmática adosada a la pipeta, que al estirarse en exceso, se estrecha y finalmente se rompe quedando el exterior hacia afuera generándose la configuración exterior hacia fuera (*outside-out*).

El sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*

El uno de los objetivos de la electrofisiología es entender los mecanismos moleculares por los cuales los iones pasan a través de los canales. Particularmente como son sus mecanismos de activación y de inactivación, los de permeación y regulación. Este tipo de experimentos se ven restringidos por carecer de un modelo experimental apropiado. La mayoría de las células que se utilizan para estudios electrofisiológicos expresan una variedad de canales endógenos, lo cual dificulta el estudio por expresión heteróloga de un solo tipo de canal aislado. Este problema puede ser parcialmente resuelto utilizando soluciones que contengan bloqueadores y iones que no pasen por los canales endógenos y así aislar el canal que se exprese. Otro problema con el que se puede enfrentar es la incapacidad de modificar artificial y sistemáticamente el gen que codifica para el canal en células intactas, excluyéndose la caracterización de la estructura-función. Por lo tanto, es necesario contar con un sistema donde la célula exprese conductancias endógenas pequeñas y en el cual un canal pueda ser estudiado por sobre expresión heteróloga.

El sistema de expresión de *Xenopus* consiste en aislar células gaméticas de hembras de *X. laevis*, las cuales después de un tratamiento suave con colagenasa son inyectadas con RNAm que codifique para canales iónicos que nos interesen. Algunas de las ventajas que ofrece este sistema son:

- a) Es relativamente sencillo aislar un gran número de células viables a partir de una sola rana donadora. Estas células pueden ser removidas por cirugía sin tener que sacrificar al animal. De este modo, una sola rana puede ser usada varias veces.
- b) Las células aisladas pueden durar poco más de una semana *in vitro*. Las células pueden permitir varios empalmientos de microelectrodos y pipetas de inyección. Además, es relativamente fácil mantener las células una vez aisladas.
- c) Los ovocitos de *Xenopus* son de gran tamaño (> a 1 mm de diámetro), lo cual hace fácil su manipulación. Esto permite de manera sencilla inyectar RNAm o DNA en el núcleo, o componentes químicos dentro de la célula.
- d) Los ovocitos expresan pocos canales endógenos. Estos formarán parte como una pequeña fracción de la corriente expresada.

Los ovocitos de *Xenopus* se han utilizado para hacer la traducción *in vivo* de RNAm de proteínas asociadas con la membrana plasmática, con las modificaciones pot-

traduccionales correctas. Por su parte, las técnicas de ingeniería genética permiten, por mutagénesis dirigida, la modificación de los RNAm que codifican para proteínas relacionadas con la membrana y así poder estudiar la relación estructura-función de la proteína.

El sistema tiene sus limitaciones. Las modificaciones post-traduccionales pueden ser diferentes comparándolas con las células de mamífero, lo cual puede resultar en proteínas con propiedades alteradas. Es imposible diseñar experimentos a temperaturas más elevadas que la ambiente. Hay que recordar que *Xenopus* es un anfibio. No obstante, de estas limitaciones los ovocitos son un sistema conveniente de expresión. De hecho, solo ciertos experimentos son posibles en ovocitos.

Aislamiento de ovocitos por cirugía e inyección de RNAm

Xenopus laevis pertenece a la familia *Pipidae*. Esta especie es endémica del sureste de África y en el laboratorio puede vivir hasta 15 años. La rana es acuática y si es removida del agua por varias horas, puede morir por desecación. Hasta 15 ranas pueden estar en el mismo acuario. Los ovocitos pueden ser removidos por cirugía sin tener que sacrificar al animal. Para hacer la cirugía primero hay que seleccionar a una rana que tenga al menos 4 semanas sin que se le haya hecho cirugía. La rana es transferida a un baño que contenga un anestésico (por ejemplo, ácido 3-aminobenzoico etil ester), el cual absorberá por la piel. Alrededor de 20-30 minutos es suficiente. Una alternativa para anestesiarse a la rana es transferirla a un baño de hielo, donde el metabolismo de la rana bajara lentamente hasta alcanzar la inconciencia. Una vez anestesiada la rana, es colocada con el dorso hacia abajo en una cama de hielo donde permanecerá durante la cirugía. Se le practica una pequeña incisión abdominal subyacente a la fascia. Parte de los ovarios pueden ser sacados y se puede observar que empaqueta muchos ovocitos. Se toman algunos y el resto son regresados a la cavidad abdominal y finalmente la escisión es suturada. La rana se transfiere a un contenedor de agua libre de anestésico para su recuperación.

Los ovocitos extraídos del ovario consisten en varias células unidas por tejido conectivo. Para la inyección de RNAm y registros electrofisiológicos, es necesario aislar los ovocitos uno por uno. Posteriormente son colocados en una solución de colagenasa (1mg/ml) a temperatura ambiente por una hora aproximadamente (el tiempo dependerá de la cantidad de ovocitos que se estén tratando). Es necesario estar revisando la digestión con colagenasa, hasta que se alcance la ruptura del tejido conectivo y se encuentren los ovocitos aislados. Después del tratamiento con colagenasa, son seleccionadas bajo un microscopio las células que se encuentren sanas y se transfieren a una incubadora con una temperatura de 19° C (para la expresión óptima). Las células sanas tienen apariencia esférica lisa, con un color café oscuro homogéneo (polo animal), y uno blanco (polo vegetal).

Finalmente los ovocitos son inyectados con RNAm que codifique para la proteína que nos interese estudiar. Aproximadamente 50 nl de agua estéril que contenga entre 0.5 – 5 ng/nl, es inyectada por ovocito. Esto se hace a través de una pipeta de inyección.

controlado por un microinyector acoplado a un micromanipulador. Después de la inyección, los ovocitos son incubados por 2 a 4 días para la expresión.

Bibliografía:

-Neher E, B Sakmann 1986 single channel recorded from membranes of denervated frog muscle fibres. Nature 260: 799-802

-Sakmann B, Neher E 1983 Single-channel recording Plenum Press New York and London