



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Medición de la dependencia en el voltaje
y la carga de apertura del canal Kv1.2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:

Itzel González Ishida

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. León David Islas Suárez



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.

Agradecimientos

A León Islas, por todo. Por ser el mejor maestro que pude haber pedido, por sus consejos, su apoyo constante y su amistad.

A los integrantes de mi jurado, los doctores Gerardo Gamba, Froylan Gómez, Alfredo Torres y Fredy Cifuentes, por leer este trabajo en tiempo récord y por sus valiosas observaciones.

A mis tutoras de primer y tercer año, las doctoras Georgina Garza-Ramos y Soledad Funes, por haberme enseñado bioquímica, por confiarme un proyecto independiente y por toda su paciencia.

A los doctores Alejandro Fernández, Alejandro Zentella y Jorge Peón, por ser excelentes profesores, por despertar mi curiosidad por los temas discutidos en clase y por haberse interesado especialmente en mi aprendizaje.

A mi mamá, Oyuky Ishida, por todo su amor y por siempre estar ahí para mí.

A mi papá, Federico González, por su apoyo incondicional y las clases de física.

A Diego Lassala, por su grata compañía.

A mis amigos Ana Maldonado, Rodrigo Huerta y Julián Madero, por hacer que mis días sean divertidos.

A Tamara Rosenbaum, por su amistad, la terapia y las recetas milenarias.

A Andrés Jara, por el apoyo técnico y su paciencia inagotable para explicar ciencia, pero sobre todo por contagiarme su entusiasmo por los canales iónicos y por sus invaluable comentarios sobre todo mi trabajo a lo largo de la licenciatura.

A mis compañeros de la LIBB, especialmente Ricardo Castro, Mauricio Cruz, Juan Espinasa, Luis Becerril, Marti Cadena, Alejandro Jiménez y Valeria López, por su amistad, por tolerar todos mis monólogos y por ser fantásticos compañeros de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biofísica de Canales Iónicos, Gisela Rangel, Ernesto Ladrón de Guevara, Víctor de la Rosa y Beatriz Rodríguez, por su amistad y porque gracias a ellos el laboratorio es un gran lugar para trabajar.

A mis compañeros del LFQIP, en especial a Haven López, Fátima Pardo, Diego Alonzo y Daniel Silva, por hacer que mi primer año de la licenciatura fuera increíblemente divertido.

A mis compañeros del 204 Sur, Manuel Semán, José Luis Aguilar, José Carlos Ponce y Fabiola Jaimes, por su amistad y por ayudarme a mejorar mis seminarios.

A mi familia cachanilla: mis abuelos Margarita Pinzón y Elías Ishida, mis tíos Elías y Oscar Ishida, mis tías Karla Cervantes y Claudia Camacho, y mis primos Elías, Rigo, Emilio y Oscar Ishida, por todo su cariño.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. León David Islas Suárez en el laboratorio de Biofísica de Canales Iónicos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto de investigación desarrollado en esta tesis fue financiado por el donativo No. 151297 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por el donativo con clave IN212612 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), del cual también recibí una beca de elaboración de tesis.

Agradezco a la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas por sus valiosas contribuciones al presente trabajo.

Agradezco también a la Fundación Alberto y Dolores Andrade por el apoyo económico proporcionado durante toda mi vida académica.

Índice

Abreviaturas	7
Resumen	8
I Introducción	10
I.1 La membrana plasmática	11
I.2 Excitabilidad, canales iónicos dependientes de voltaje y Kv1.2	13
I.3 Canales de potasio dependientes de voltaje: Organización y estructura .	14
I.3.1 Dominio del poro	15
I.3.2 Dominio sensor de voltaje	17
Justificación	25
Objetivos	26
II Métodos	27
II.1 Biología molecular y expresión heteróloga de Kv1.2	27
II.2 Electrofisiología	29
II.2.1 Fijación de voltaje en microáreas de membrana (<i>patch-clamp</i>) .	29
II.2.2 Adquisición y análisis de datos	30
II.2.3 Soluciones	37
III Resultados	38
III.1 Propiedades de la corriente macroscópica de Kv1.2	38
III.2 Mutaciones en el poro de Kv1.2	40
III.3 Corrientes de compuerta de Kv1.2	42
III.4 Modelo cinético de las corrientes macroscópicas de Kv1.2	43
III.5 Medición de la carga de apertura aparente: Pendiente límite	45
III.6 Medición de la carga de apertura: Corrientes de Cs ⁺ y de compuerta . .	45
III.7 Mutaciones en el dominio sensor de voltaje de Kv1.2	48

III.8	Contribución de los residuos cargados del S4 a la detección del voltaje .	49
IV	Discusión	52
IV.1	Propiedades macroscópicas de Kv1.2	52
IV.2	Carga de apertura de Kv1.2	53
IV.3	Impacto en el campo de la detección de voltaje	55
	Conclusiones	56
	Bibliografía	57

Abreviaturas

Å	Ångström, 10^{-10} m
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
Canal Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
DSV	Dominio sensor de voltaje
e_0	Carga elemental
G	Conductancia
I	Corriente
N	Número de canales
P_o	Probabilidad de apertura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
S4	Segmento transmembranal 4
TEA	Tetraetilamonio

Resumen

La actividad eléctrica de las neuronas depende del paso selectivo de iones a través de su membrana plasmática, que ocurre principalmente a través de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Estos canales abren poros en la membrana en respuesta a cambios en el potencial transmembranal, permitiendo el flujo de iones y generando una señal eléctrica. La sensibilidad particular de cada canal al voltaje determina las propiedades fisiológicas de las neuronas que lo expresan: mientras más sensible sea, se necesitará un menor cambio en el potencial para activarlo y viceversa. Dicha sensibilidad es conferida por un dominio con una serie de residuos básicos presente en todos los canales dependientes de voltaje, el dominio sensor de voltaje (DSV). El mecanismo de activación del DSV se ha estudiado a lo largo de varias décadas en los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv), especialmente usando un canal llamado *Shaker* como proteína modelo. Sin embargo, existen muy pocas estructuras cristalográficas de canales Kv, y la que se utiliza de manera frecuente como contraparte estructural para la multitud de observaciones en *Shaker* es la de un canal de mamífero llamado Kv1.2. Dado que las propiedades funcionales de Kv1.2 no han sido estudiadas extensivamente, no está claro que los dos canales sean suficientemente similares como para validar la interpretación de experimentos de *Shaker* en términos de la estructura de Kv1.2.

Este trabajo pretende determinar si Kv1.2 y *Shaker* son iguales, y de no ser así, encontrar el origen de las diferencias entre ellos. Como primera aproximación se analizaron las propiedades de las corrientes macroscópicas de Kv1.2 y se ajustaron a un modelo propuesto anteriormente para *Shaker*, la única diferencia observable entre ambos canales es que la cinética de activación de Kv1.2 es más lenta que la de *Shaker*. Posteriormente se midió la sensibilidad al voltaje de Kv1.2 con el método de la pendiente límite, y se encontró que el movimiento de $10 e_0$ a través del campo eléctrico de la membrana está acoplado a la apertura del poro. Para complementar la medición anterior, se evaluó directamente el desplazamiento de carga durante la activación del DSV integrando corrientes de compuerta y estimando el número de canales en el mismo experimento, y se determinó que en Kv1.2 se translocan $10 e_0$ cuando el DSV se activa. Estos resultados muestran que Kv1.2 es 25 % menos sensible a la despolarización que *Shaker*, cuyo DSV transloca $13 e_0$ al activarse. La concordancia entre las dos mediciones de la carga de apertura revela que no hay transiciones dependientes de voltaje hacia estados fuera de la vía de activación, dado que todo el movimiento de carga del DSV está ligado a la apertura del poro. Con el propósito de encontrar el origen de la reducción en la carga de apertura con respecto a *Shaker*, se construyeron mutantes de Kv1.2 en las cuales se neutralizaron los residuos más importantes para la detección del voltaje,

cuatro argininas en el cuarto segmento transmembranal del DSV. Se encontró que la primera Arg de dicho segmento es más importante para la detección del voltaje que el resto de las cargas positivas de la hélice, a diferencia de *Shaker*, donde los primeros cuatro residuos cargados tienen una contribución equivalente a la carga de apertura. Las propiedades de las mutantes son consistentes con un modelo donde la región que separa eléctricamente la solución intracelular de la extracelular en la proximidad de la hélice cargada es más gruesa en el DSV de Kv1.2 que en *Shaker*.

Capítulo I

Introducción

La membrana plasmática, una bicapa lipídica, separa el contenido de la célula del medio exterior al ser una barrera impermeable para entidades polares o cargadas. Sin embargo, muchos elementos y compuestos necesarios para el metabolismo de la célula están cargados, y para ser capaz de transportarlos, la célula insertó poros selectivamente permeables en la membrana. La apertura de dichos poros, llamados canales iónicos o acarreadores dependiendo de su modo de transporte, permite la entrada y salida de iones. El funcionamiento de los acarreadores provoca una asimetría de carga y concentración de solutos a ambos lados de la membrana, en contraste, la apertura de canales iónicos disipa el gradiente electroquímico.

El gradiente electroquímico es aprovechado por la célula para varios propósitos, entre ellos la señalización. Numerosos fenómenos de la fisiología de todos los seres vivos están relacionados con la apertura de canales iónicos en respuesta a un estímulo como presión, luz, voltaje o un ligando (Figura I.1). Uno de los ejemplos más notables del aprovechamiento del gradiente electroquímico es la transmisión de impulsos eléctricos a través del sistema nervioso, el modo por excelencia para comunicar rápidamente diferentes partes del cuerpo de un ser vivo.

El protagonista de esta tesis es una proteína importante para la transmisión de señales eléctricas en el sistema nervioso de los mamíferos: un canal permeable a potasio que se abre cuando el potencial de membrana se hace positivo. El tema principal del trabajo es el mecanismo por el cual este canal de potasio es capaz de responder a cambios en el potencial de membrana con una sensibilidad asombrosa. A continuación se presentan brevemente los principios del transporte a través de las membranas biológicas y una revisión de la literatura relevante para el trabajo que se muestra en secciones posteriores.

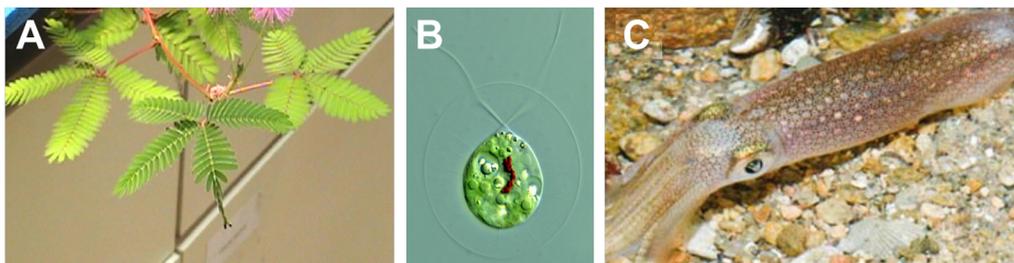


Figura I.1: Fenómenos causados por flujo de iones a través de la membrana plasmática. (A) Las hojas de la planta *Mimosa pudica* se cierran cuando son tocadas o expuestas a temperaturas nocivas. (B) El alga flagelada *Haematococcus pluvialis* nada en dirección a la luz, un fenómeno conocido como fototaxis positiva. (C) El calamar *Loligo pealeii* es capaz de camuflarse expandiendo y contrayendo pequeños sacos de pigmento en su piel, llamados cromatóforos. Imágenes modificadas de [1, 2, 3].

I.1. La membrana plasmática

La membrana plasmática delimita la célula y mantiene las diferencias de carga y concentración de solutos entre el citoplasma y el medio extracelular. De la misma manera, las membranas de los organelos separan la luz del organelo y el citosol. La compartimentalización genera microambientes que favorecen distintos tipos de reacciones químicas, y consecuentemente es la responsable de la gran diversidad de procesos que se pueden llevar a cabo dentro de una célula eucarionte.

Todas las membranas biológicas son una bicapa de unos 50 Å de grosor compuesta por una mezcla de lípidos con proteínas. La composición y distribución de los lípidos determina varias propiedades de la membrana, como la fluidez y la actividad de las proteínas contenidas en ella. El hecho de que la membrana sea hidrofóbica implica que es difícil que solutos cargados total o parcialmente puedan atravesarla, por lo que la distribución de iones en ambos lados de la membrana está determinada por la actividad de las proteínas que son capaces de transportarlos. En condiciones normales, existe un gradiente electroquímico donde hay más Na^+ y Cl^- afuera que adentro de la célula, y más K^+ adentro que afuera (Tabla I.1).

Ion (X)	$[\text{X}]_o$ (mM)	$[\text{X}]_i$ (mM)
K^+	4.5	155
Na^+	145	12
Cl^-	116	4.2

Tabla I.1: Concentración intracelular y extracelular de los iones principales en una célula de mamífero típica. Datos tomados de [4]. *i* y *o* denotan adentro y afuera de la célula, respectivamente.

El hecho de que haya una distribución asimétrica de iones implica que cuando se abra un conducto en la bicapa, los iones fluirán para compensar las diferencias de carga y concentración entre ambos lados de la membrana. El voltaje al cual el ion está en equilibrio es conocido como potencial de inversión, y este fenómeno es descrito cuantitativamente por la ecuación de Nernst:

$$V_{rev} = \frac{RT}{z_x F} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i} \quad (\text{I.1})$$

donde V_{rev} es el potencial de inversión, z_x es la valencia del ion X , $[X]_i$ y $[X]_o$ son sus concentraciones intra y extracelulares, R es la constante de los gases ideales y F es la constante de Faraday. El potencial de reposo de una célula es determinado por la permeabilidad de su membrana a cada tipo de ion: mientras más permeable sea, la membrana se acercará más al potencial de equilibrio predicho por la ecuación de Nernst para ese ion. Las proteínas que transportan solutos en contra del gradiente electroquímico se denominan transportadores o bombas, y acoplan el flujo cuesta arriba a la hidrólisis de nucleótidos o al flujo de otro soluto a favor del gradiente. Las proteínas que disipan el gradiente al permitir el paso de solutos a favor del gradiente se conocen como canales [5].

Un ejemplo de cómo se genera un gradiente electroquímico es la actividad de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, que acopla la hidrólisis de una molécula de ATP a la salida de 3 iones de sodio y la entrada de 2 iones de potasio. La actividad de la bomba tiene dos efectos. Primero, se disequilibra la concentración de sodio y potasio a través de la membrana, porque salen 3 Na^+ y entran 2 K^+ netos. Segundo, cada ciclo de la bomba hace al interior de la célula una carga elemental más negativo que el medio extracelular, porque salen tres cationes y entran dos. El hecho de que haya mucho más K^+ adentro de la célula que afuera implica que si se abre un poro selectivo a K^+ en la membrana, el potasio fluirá hacia afuera y hará el interior de la célula aún más negativo. En efecto, estos canales existen y son los principales determinantes del valor del potencial de membrana en el estado basal, junto con la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. La presencia de aniones impermeables como el ADN también juega un papel en disequilibrar la concentración de iones en ambos lados de la membrana. Todos estos factores, tomados juntos, causan que el interior de las células sea mucho más negativo que el exterior, y que sea capaz de generar flujos grandes de iones cuando se abren poros en la membrana.

I.2. Excitabilidad, canales iónicos dependientes de voltaje y Kv1.2

El gradiente electroquímico es aprovechado por las células en muchas maneras, una de ellas es la propagación de señales de voltaje a lo largo de la membrana de las células excitables. Los potenciales de acción, como son conocidas estas señales, tienen una forma característica que está dada por la actividad conjunta de diferentes tipos de canales iónicos (Figura I.2).

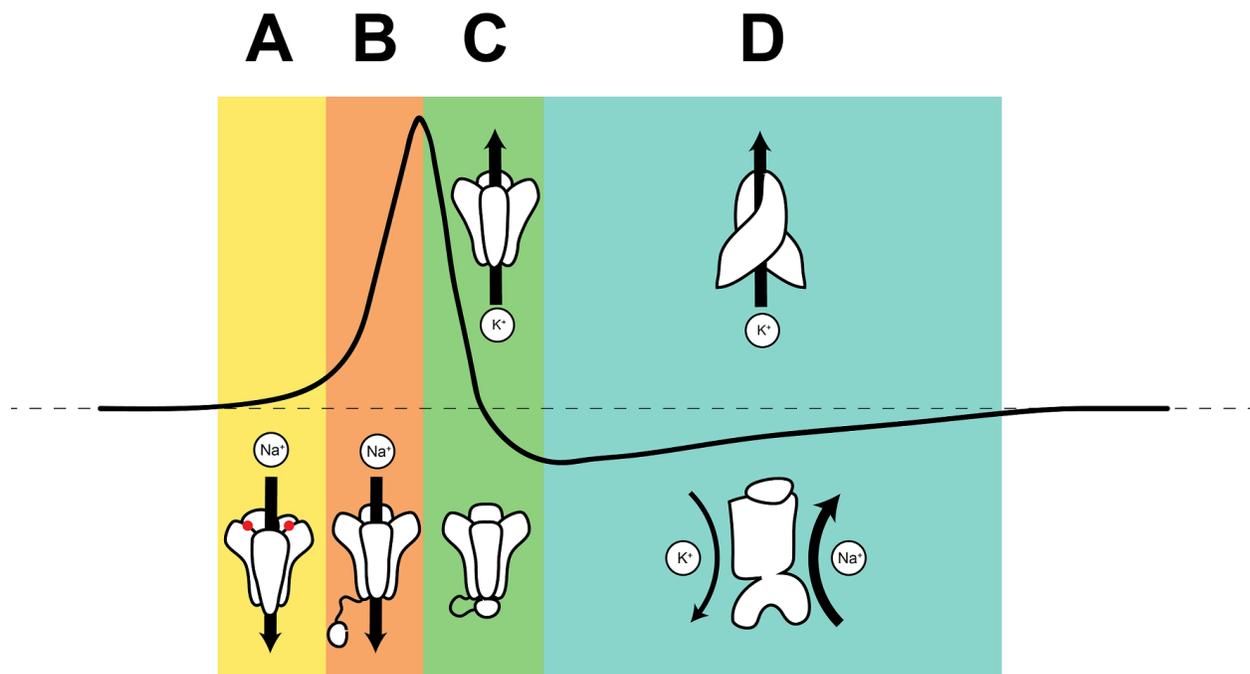


Figura I.2: Canales iónicos asociados a cada fase de un potencial de acción clásico. (A) La membrana sufre una despolarización inicial por entrada de sodio a través de un canal activado por un ligando extracelular. (B) Esta despolarización débil activa canales de sodio dependientes de voltaje, que permiten la entrada de más Na⁺ y consecuentemente la membrana sufre una despolarización masiva. (C) Pocos milisegundos después, los canales de Na⁺ se inactivan y canales de potasio dependientes de voltaje se abren, permitiendo la salida de K⁺ y repolarizando a la célula. La salida excesiva de K⁺ causa que el potencial de membrana se haga más negativo que el potencial de reposo. (D) Los canales de K⁺ se cierran porque el voltaje es muy negativo, y el gradiente electroquímico regresa al estado basal mediante la acción conjunta de canales de fuga de K⁺ y la bomba de Na⁺-K⁺. Aunque sólo se muestran en este panel de la figura, los canales de fuga y la bomba de Na⁺-K⁺ siempre están activos y se encargan de mantener el potencial de membrana basal.

En este trabajo se estudió un miembro representativo del grupo de proteínas ilustradas en la Figura I.2 C, el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.2. Este canal se activa cuando

el potencial de membrana se hace positivo (despolarización), permitiendo la salida de K^+ de las células que lo expresan. Kv1.2 se encuentra distribuido ampliamente en el tejido excitable de los mamíferos, más notablemente en los axones y terminales presinápticas de neuronas del sistema nervioso central [6]. La función de Kv1.2 es contribuir a la repolarización de la célula durante un potencial de acción, y su importancia para la fisiología de los mamíferos es resaltada por el hecho de que los ratones *Kcna2*^{-/-} mueran por un ataque epiléptico antes de llegar a la etapa adulta [7].

Aunque Kv1.2 es una proteína fisiológicamente importante, esa no es la razón por la cual decidimos estudiarlo. Kv1.2 es uno de los pocos canales dependientes de voltaje cuya estructura se conoce, y como tal, es un modelo excelente para la investigación de la relación estructura-función de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).

I.3. Canales de potasio dependientes de voltaje: Organización y estructura

La familia de canales Kv se dedica a permitir el paso de K^+ a través de la membrana cuando recibe una señal en la forma de un cambio en el potencial transmembranal. Comúnmente funcionan como homotetrámeros, y cada subunidad está constituida por al menos dos elementos fundamentales para la detección del voltaje y la conducción iónica: el dominio sensor de voltaje (DSV) y el dominio del poro, respectivamente. Cada dominio posee seis segmentos transmembranales. Adicionalmente, la mayoría de los canales Kv presentan un dominio citoplásmico en el extremo N-terminal, llamado T1, que sirve como plataforma para la unión de subunidades regulatorias y para la tetramerización [8, 9, 10] (Figura I.3 A). Otros canales de potasio dependientes de voltaje tienen dominios extra que permiten la modulación de su actividad por ligandos como nucleótidos cíclicos o Ca^{2+} [11, 12]. El DSV interactúa directamente con el campo eléctrico de la membrana y está acoplado al dominio del poro, de tal manera que cuando se detectan cambios en el potencial y el DSV se mueve, el poro se abre o se cierra (Figura I.3 B).

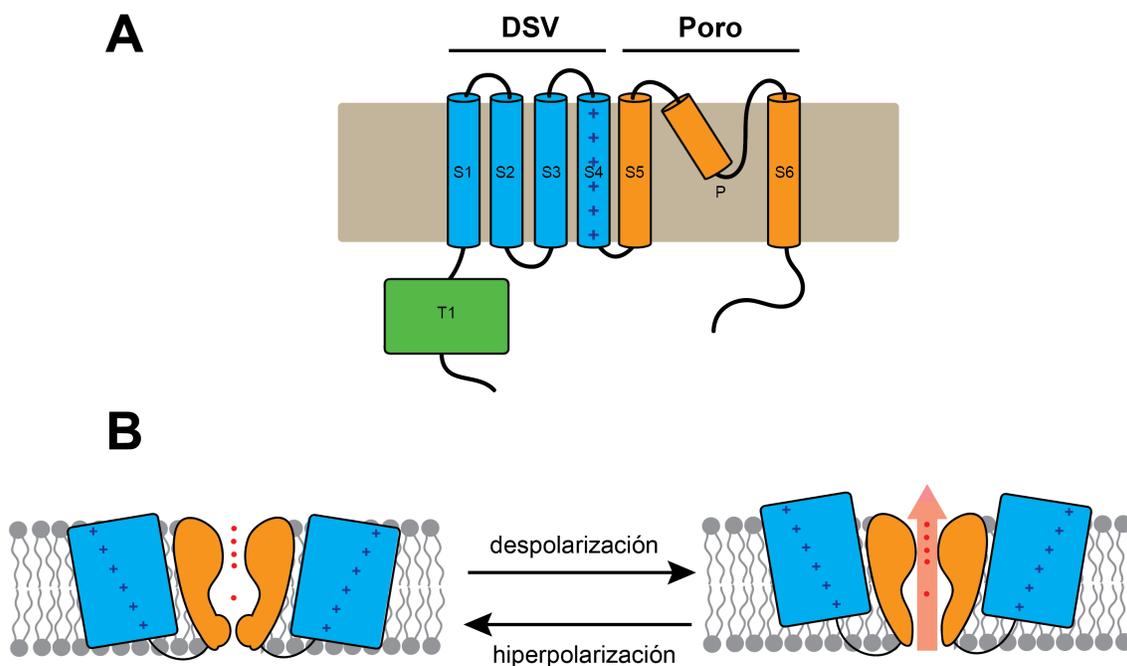


Figura I.3: Organización de los dominios de una subunidad de un canal Kv. (A) En el extremo N-terminal hay un dominio soluble, T1, que recluta subunidades accesorias. Los primeros cuatro segmentos transmembranales, S1 a S4, constituyen el dominio sensor de voltaje. S4 tiene múltiples Arg/Lys a lo largo de la hélice. El poro es formado por las últimas dos hélices transmembranales, S5 y S6, que están conectadas por el asa P. (B) El poro de los canales Kv se abre cuando el DSV se mueve hacia la cara extracelular de la membrana en respuesta a una despolarización.

I.3.1. Dominio del poro

Dos hélices transmembranales conectadas por un asa llamada P constituyen el dominio del poro. Aquí se encuentran dos elementos estructurales que permiten que el canal cumpla su función más esencial, la permeación. El *filtro de selectividad* se encarga de permitir el flujo de potasio al mismo tiempo que impide el de sodio bajo condiciones fisiológicas, y la *compuerta de activación* es un sello que bloquea la vía de conducción en el estado cerrado y se rompe cuando el canal se abre [13].

La primera estructura de un canal de K^+ que se resolvió fue la de KcsA, un canal procarionte que es únicamente un dominio del poro [14]. Este trabajo pionero reveló el principio por el cual los canales de potasio son capaces de discriminar Na^+ y permitir la conducción extremadamente rápida de K^+ : los grupos carbonilo de una secuencia altamente conservada en el asa P están organizados de tal manera que asemejan la capa de hidratación de K^+ , así que pasar de una solución al filtro prácticamente no tiene costo energético (Figura I.4 A). La inestabilidad de un ion dentro de la membrana es máxima en el centro de la bicapa,

y esta dificultad es resuelta por una cavidad acuosa en el centro de la membrana hacia la cual apuntan los extremos con carga parcialmente negativa de los dipolos de las hélices del asa P.

Debajo del filtro y la cavidad, el extremo C-terminal de S6 forma una obstrucción del poro cuando el canal se encuentra en el estado cerrado, al recibir un estímulo activador, el cúmulo de hélices se separa y permite el flujo de iones a través del poro [15]. El movimiento del extremo C-terminal del S6 había sido comprobado con múltiples experimentos electrofisiológicos [16, 17], pero la explicación estructural fue posible hasta la publicación de la estructura de MthK, un canal de K^+ procarionte de dos segmentos transmembranales que es activado por Ca^+ [18]. MthK se encuentra en el estado abierto dentro del cristal, y la comparación de su estructura con la de KcsA, que está cerrado, reveló la naturaleza del cambio conformacional de S6 entre ambos estados de la compuerta (Figura I.4 C). Aunque ni KcsA ni MthK lo poseen, la mayoría de los canales de potasio dependientes de voltaje presentan un motivo PXP a la mitad de S6, que funciona como una bisagra para la apertura y cierre de la compuerta de activación [15].

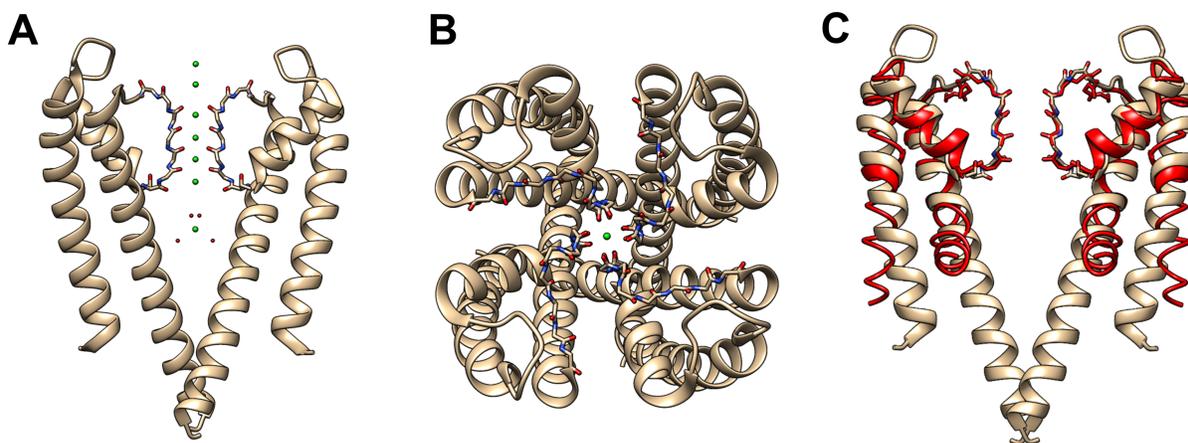


Figura I.4: Canal de potasio KcsA (PDB 1K4C). (A) Vista de la vía de conducción desde el plano de la membrana. Únicamente se muestran dos subunidades por claridad. Los puntos verdes corresponden a átomos de K^+ , los puntos rojos representan moléculas de agua. (B) Vista de la vía de conducción desde la cara extracelular de la membrana. (C) Superposición de los poros de KcsA (blanco) y MthK (rojo, PDB 1NLQ). La compuerta de KcsA se encuentra en el estado cerrado y MthK en el abierto. La compuerta de activación, constituida por la mitad C-terminal de S6, se separa para despejar la vía de conducción iónica cuando el poro se abre en respuesta a algún estímulo.

Existen múltiples formas de detener la conducción iónica, una de ellas es cerrar la compuerta de activación mencionada anteriormente. Otra manera es tapan el poro con un dominio presente en el extremo N-terminal de algunos canales Kv, a este fenómeno se le conoce como inactivación tipo N y es bastante rápida, en el orden de milisegundos [19] (Figura I.5 A). Un tipo de inactivación más lenta, llamada tipo C, impide la permeación al alterar la conformación del filtro de selectividad [20]. Aunque el mecanismo de la inactivación tipo C aún es controversial, se ha propuesto que el canal deja de conducir porque el sitio de unión a K^+ más extracelular en el filtro de selectividad se dilata, de tal manera que es incapaz de coordinar al ion fácilmente e impone una barrera energética incompatible con la conducción [21] (Figura I.5 B).

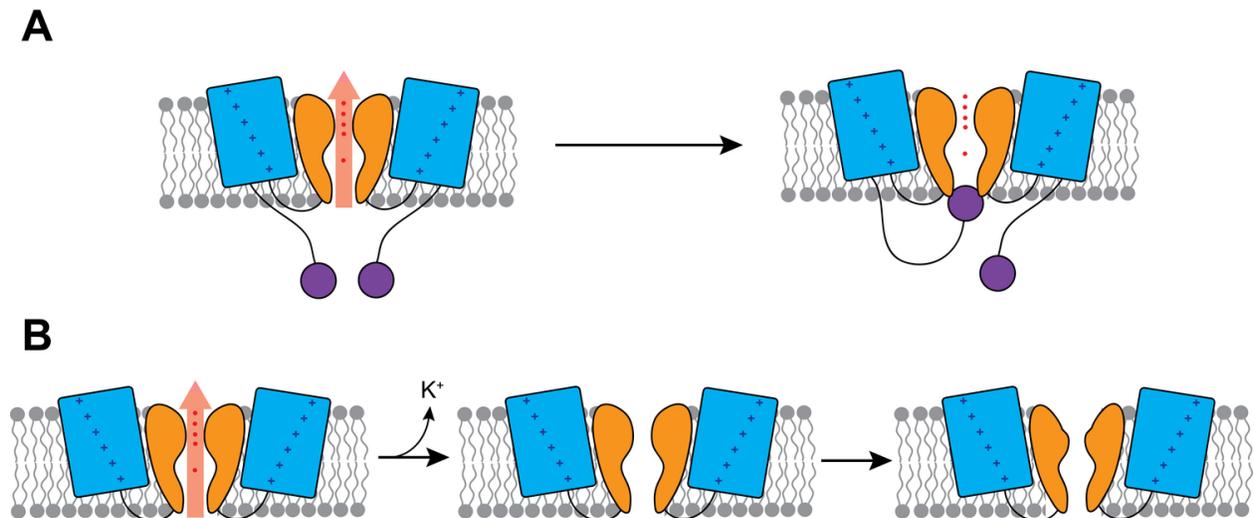


Figura I.5: Dos modos de inactivación en los canales Kv. (A) Inactivación tipo N, donde un péptido en el extremo N-terminal bloquea la conducción rápidamente después de que la compuerta de activación se abre. (B) Inactivación tipo C, donde el filtro de selectividad sufre un cambio conformacional que impide la coordinación de K^+ .

En resumen, el dominio del poro se encarga directamente de permitir o impedir el flujo de iones a través de la membrana. En canales más grandes que KcsA y MthK, el poro es modulado por dominios adicionales que son receptivos a diversos estímulos, como fue mencionado anteriormente. El estímulo concerniente a este trabajo es el voltaje, y a continuación se describen las características del dominio que responde a este.

I.3.2. Dominio sensor de voltaje

El dominio distintivo de todos los canales dependientes de voltaje tiene cuatro segmentos transmembranales. Uno de ellos, S4, posee múltiples residuos básicos a lo largo de la hélice,

y estos son los principales detectores de los cambios en el potencial transmembranal [22]. Los primeros tres segmentos, S1 a S3, escudan a las cargas positivas de S4 de la porción hidrofóbica de los lípidos de la bicapa. La Figura I.6 muestra la estructura del DSV de Kv1.2.

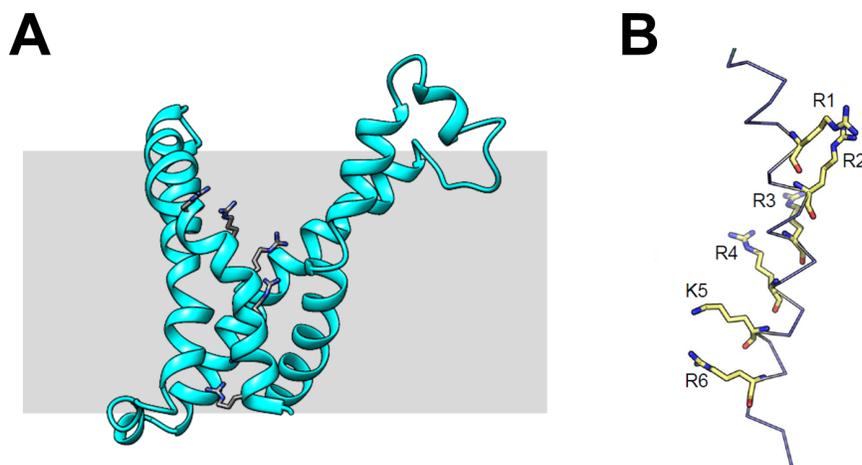


Figura I.6: Estructura atómica del DSV de Kv1.2 (se presenta un modelo refinado a partir del PDB 2A79 [23]). (A) DSV completo de una sola subunidad, se muestran los segmentos transmembranales 1 a 4. Las únicas cadenas laterales que se muestran son las de los residuos básicos de S4. (B) Posición de las cargas a lo largo de S4.

La estructura del sensor de voltaje revela información que facilita la comprensión de su funcionamiento. Sin embargo, antes de que se resolviera la estructura cristalográfica de un DSV, un cuerpo considerable de trabajo había establecido los principios de su operación. Para principios de la década de los 90s, las características fundamentales de la detección del voltaje eran ampliamente aceptadas por la comunidad científica:

1. La activación de la corriente iónica es precedida por una corriente capacitiva no lineal, llamada corriente de compuerta, que revela el desplazamiento de carga positiva desde el interior de la célula hasta el exterior a través del campo eléctrico de la membrana [24, 25],
2. Un segmento transmembranal con múltiples residuos básicos, S4, es el principal sensor de cambios en el potencial transmembranal, y su movimiento es responsable de la corriente de compuerta [26, 27].

La translocación de carga durante la activación del canal, denominada carga de apertura, fue estudiada rigurosamente por varios grupos de investigación. La carga de apertura

está íntimamente relacionada con la fisiología de la célula que lo expresa, porque mientras más carga se transloque, el canal es más sensible al voltaje y requiere de un cambio menor en el potencial transmembranal para activarse.

Mediciones de la carga de apertura

Una de las primeras mediciones rigurosas de la carga de apertura fue realizada en 1992 usando un canal de K^+ dependiente de voltaje de *Drosophila*, *Shaker*. Este estudio fue innovador porque relacionó la cantidad de carga desplazada en las corrientes de compuerta con el número de canales presentes en la misma área de membrana, y se encontró que alrededor de 12 cargas elementales pasan del ambiente eléctrico intracelular al extracelular durante la activación de un solo canal [28]. Estudios subsecuentes confirmaron este hallazgo y añadieron información sobre las propiedades del DSV. Un artículo publicado en 1996 reportó la carga de apertura de *Shaker* usando otro método para medir el número de canales –usando radioligandos que se unen con una estequiometría 1:1 al canal– y también estimó la contribución de los residuos básicos del S4 a través de canales con neutralizaciones puntuales de cada una de las siete cargas del S4 putativo. En este estudio se encontró que la carga de apertura era de alrededor $13 e_0$, muy similar a las mediciones previas, y que la mayor parte de la carga es transportada por los primeros cuatro residuos positivos del S4 [29].

La carga de apertura de *Shaker* también fue medida por el método de la pendiente límite en 1999 [30], resultando en un valor de 12-13 e_0 [31]. El método de la pendiente límite no mide directamente el desplazamiento de carga en la forma de corrientes de compuerta, sino que hace uso de la sensibilidad del canal a cambios en el voltaje para estimar la carga involucrada en las transiciones desde un estado completamente desactivado hasta el abierto. Por esta razón, ambos tipos de mediciones revelan información diferente: las corrientes de compuerta son una manifestación del desplazamiento físico de cargas elementales a través del campo eléctrico transmembranal, mientras que la sensibilidad al voltaje está dada únicamente por la translocación de carga que está acoplada energéticamente a la apertura del poro del canal [32]. En *Shaker*, la concordancia entre los resultados de las dos técnicas indica que todo el movimiento de carga está ligado a la apertura del poro [33].

La interpretación de la carga de apertura no es trivial: qué clase de movimiento de una proteína sería capaz de hacer que 12-14 entidades con una carga de +1 atravesen los 30 Å de grosor de la bicapa lipídica? En realidad, la detección experimental de la translocación de una carga elemental no necesariamente significa que una sola carga atravesó la totalidad del campo eléctrico transmembranal, también puede ser resultado de que varias cargas atraviesan una fracción del dieléctrico (Figura I.7) [34].

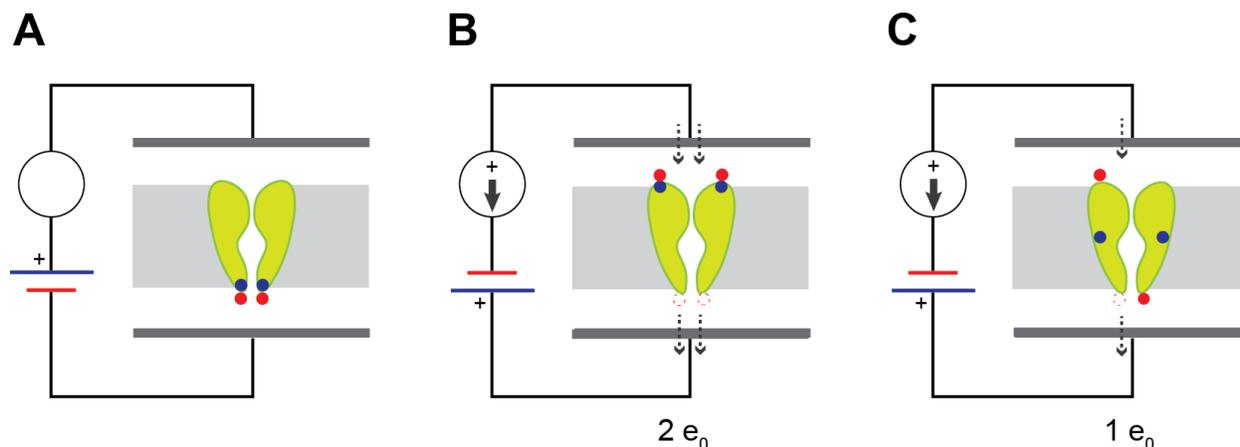


Figura I.7: Significado experimental de la carga de apertura. El desplazamiento de carga a través de la membrana se mide usando la técnica de fijación de voltaje (ver sección II.2.1). (A) Considérese una proteína con dos cargas elementales móviles (puntos azules), capaces de atravesar el campo eléctrico de la membrana (área gris). (B) Al despolarizar la membrana, las cargas se mueven desde la cara interna de la membrana hasta la externa, causando otro cambio en el potencial. Para mantener el voltaje deseado en un valor constante, el equipo de fijación de voltaje compensa esas dos cargas positivas moviendo un par de aniones (puntos rojos) a la cara extracelular. Lo que se detecta técnicamente no es el movimiento de los puntos azules, sino cuántos puntos rojos se necesitan para compensar. (C) Si las mismas dos cargas consideradas en el panel anterior atraviesan la mitad del campo, el equipo sólo necesita una carga negativa para compensar. Por lo tanto, experimentalmente, la carga de apertura es el producto de la valencia del ion móvil y la distancia eléctrica que atraviesa. Figura modificada de [34].

Aunque es más sencillo explicar la carga de apertura considerando que no es necesario que una carga se transloque por completo para detectarla, esta explicación no resuelve completamente el problema que impone mover tanta carga a través de una distancia tan larga. Con esa cuestión en mente, múltiples laboratorios demostraron que el campo eléctrico de la membrana es significativamente más corto en la vecindad del DSV porque existen cavidades acuosas que rodean al S4.

Electrostática del dominio sensor de voltaje

La primera evidencia experimental de la existencia de cavidades accesibles al solvente dentro del DSV fue provista por ensayos de accesibilidad. En estos estudios se notó que residuos que aparentemente estaban a la mitad de un segmento transmembranal (según predicciones de estructura secundaria) eran accesibles a reactivos modificadores de cisteínas, y que el efecto era dependiente del estado de activación del S4 [35, 36]. Experimentos posteriores mostraron que el efecto de la fuerza iónica sobre las corrientes de compuerta era más grande de lo que se esperaba si la membrana fuera un dieléctrico planar en la región del

movimiento de la carga de apertura, y los autores propusieron la existencia de una cavidad acuosa en la vecindad del S4 que se extiende desde el lado intracelular de la membrana. Sus resultados sugieren que la hendidura es tan profunda que confina la región de decaimiento de potencial a un septo de 3-5 Å de grosor cercano a la región extracelular [37]. Otra serie de trabajos encontraron que si se sustituye la primera arginina del S4 por una histidina, el DSV es capaz de conducir corrientes de protones cuando se encuentra en la conformación desactivada. Para que la conducción rápida de protones sea posible es necesario que la histidina artificial esté en contacto con el solvente a ambos lados de la membrana, lo cual sugiere fuertemente que el dieléctrico que separa la solución intracelular de la extracelular en la proximidad del DSV es sumamente delgado, de alrededor de 3 Å [38, 39, 40]. En un grupo de artículos más, se demostró que una cisteína colocada en la posición de la primera Arg de S4 era capaz de transportar la carga de *Shaker* silvestre cuando era modificada con reactivos básicos pequeños, pero que la capacidad de restaurar la carga de apertura al valor original era perdida progresivamente al aumentar el tamaño del reactivo. La relación entre la capacidad del agente modificador para translocar carga y su tamaño resultó en un estimado del grosor del septo dieléctrico de 3 a 6 Å [41]. Todas estas elegantes investigaciones fueron realizadas en *Shaker*, y sus conclusiones concuerdan extraordinariamente: las cargas del S4 no se encuentran enterradas en la proteína ni en el dieléctrico de la membrana, sino que se encuentran en contacto con el solvente, y la existencia de cavidades acuosas en el DSV concentra el campo eléctrico de la membrana en un septo de unos pocos ångströms de grosor de tal manera que un desplazamiento corto de S4 es capaz de translocar toda la carga de apertura (Figura I.8).

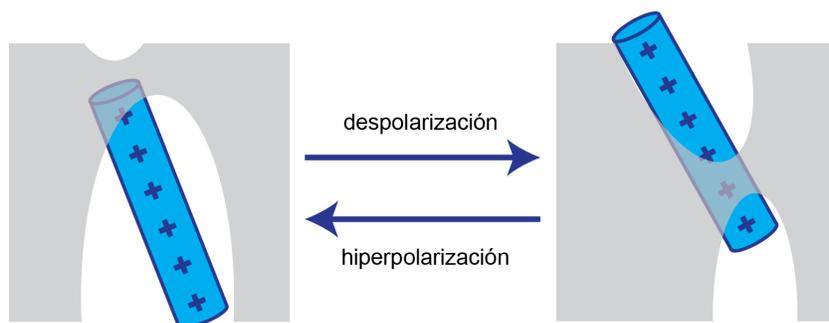


Figura I.8: Modelo del campo eléctrico de la membrana alrededor DSV. La región que separa eléctricamente la solución intracelular de la extracelular (área gris) es mucho más delgada en la vecindad del S4.

Estructura atómica del DSV y simulaciones de dinámica molecular

Durante los años en los que se realizaron los trabajos proponiendo que gran parte del S4 se encuentra en contacto con el solvente, también se publicó la primera estructura cristalográfica de un canal Kv de la archaean *Aeropyrum pernix*, llamado KvAP [42]. La estructura de KvAP fue excepcionalmente controversial porque el S4 se encuentra en un plano casi perpendicular al de la membrana, y sus argininas y lisinas aparentemente están expuestas al ambiente hidrofóbico del interior de la bicapa (Figuras I.9 A y B). Esta conformación no solamente contradice el sentido común, sino que impone un serio problema energético y es irreconciliable con esencialmente toda la información sobre la orientación del S4 que se había colectado usando electrofisiología [43]. El laboratorio que resolvió la estructura de KvAP la defendió proponiendo nuevos modelos de activación del DSV, consistentes únicamente con los datos de difracción de rayos X [44]. Tiempo después, el mismo grupo de investigación publicó la estructura de un DSV que está de acuerdo con todas las observaciones electrofisiológicas previas: el canal de mamífero Kv1.2 (Figura I.9 C y D) [45]. Kv1.2 se encuentra en el estado abierto en el cristal, y la arquitectura de su DSV es marcadamente diferente a la de KvAP. La comunidad científica ahora usa la estructura de Kv1.2 como un modelo estructural de los canales de potasio dependientes de voltaje.

Otro par de años después, el mismo laboratorio de Kv1.2 y KvAP resolvió la estructura de un canal Kv1.2 quimérico que tiene el S4 y la mitad C-terminal de S3 del canal Kv2.1 [46]. Lo más notable de este trabajo es que el canal fue cristalizado en complejo con lípidos y que la estructura se encuentra resuelta a mayor resolución que la de Kv1.2 silvestre (2.4 vs 2.9 Å), lo cual la hace excepcionalmente adecuada para estudios de dinámica molecular. El problema es que Kv2.1 tiene una secuencia atípica precisamente en la región que fue transplantada en Kv1.2, así que hay que tener esto en mente al momento de juzgar las dinámicas del DSV que usan las coordenadas atómicas de la quimera [47, 48]. Otros laboratorios hacen uso de modelos refinados de la estructura de Kv1.2 silvestre [23, 49].

Una gran dificultad para la simulación del cambio conformacional exacto que sufre el DSV es que no se ha publicado una estructura del DSV en el estado desactivado. Dado que se desconoce la posición de los residuos del S4 antes de que el DSV se active, las simulaciones de la trayectoria del S4 dependen completamente de la calidad del modelo estructural que los autores propongan para representar el estado desactivado del DSV. La ausencia de datos cristalográficos ha dado pie, naturalmente, a que los modelos del estado cerrado se construyan usando la riqueza de datos funcionales de *Shaker* como restricciones [50]. En todos los artículos de dinámica molecular estudiados durante la realización de este trabajo, se asume

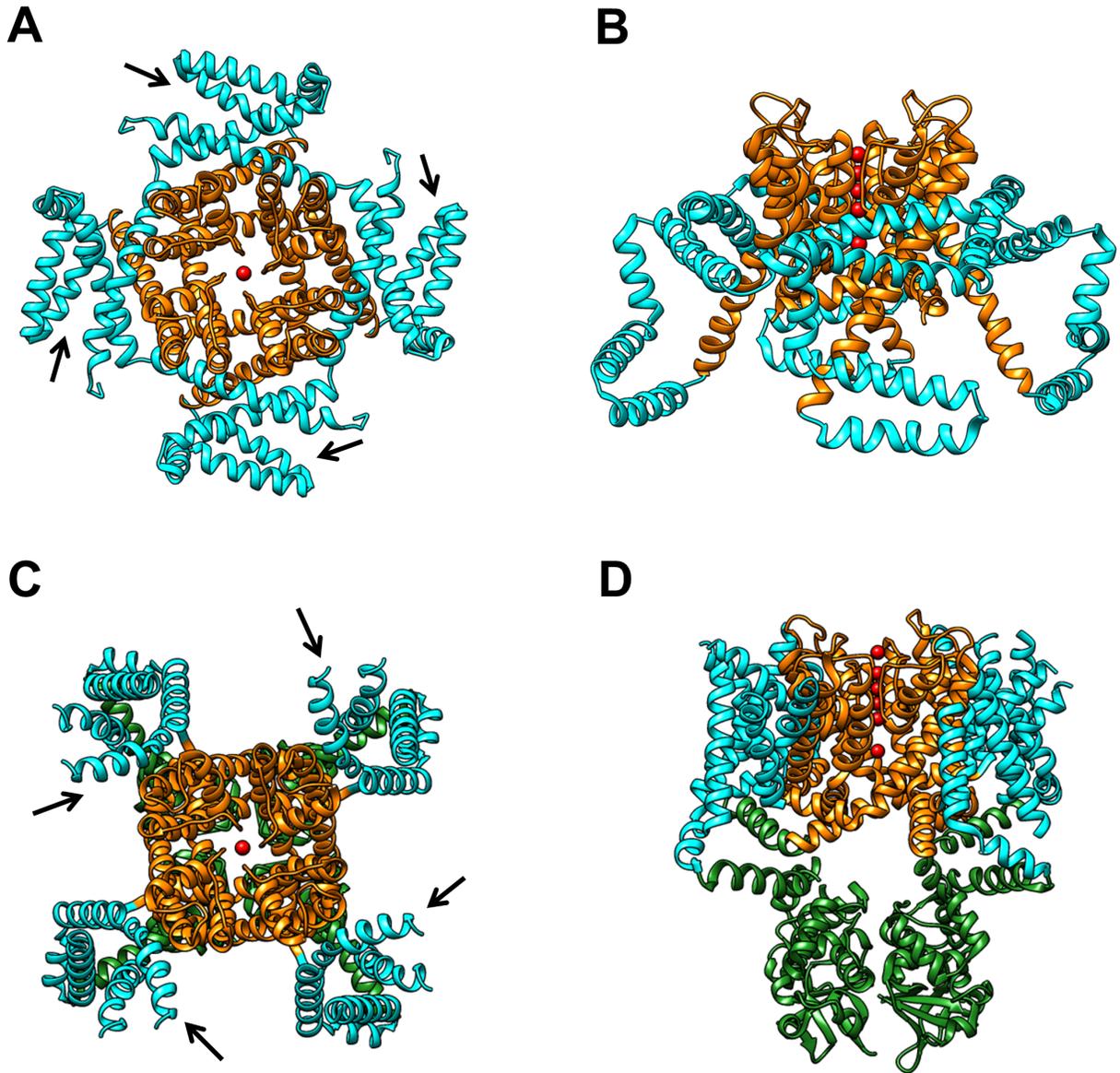


Figura I.9: Estructura cristalográfica de KvAP y Kv1.2 (PDB 1ORQ y 2A79, respectivamente). (A) KvAP visto desde la solución extracelular y (B) desde el plano de la membrana. (C) Kv1.2 visto desde la solución extracelular y (D) desde el plano de la membrana. Por claridad, solamente se muestran dos subunidades. El esquema de colores es el mismo que en la Figura I.3, con el DSV coloreado en azul, el poro en naranja y el dominio T1 en verde. Las flechas negras señalan el S4.

que se deben translocar 12-14 e_0 a través del dieléctrico membranal, y que el campo eléctrico debe estar concentrado en un área muy pequeña. Esta también es una observación que no tiene evidencia estructural directa, porque aunque se observan cavidades en la proteína, no hay agua explícita dentro de ellas, por lo tanto no se puede determinar a que grado se concentra el campo eléctrico. Sin embargo, Kv1.2 no es *Shaker*, y sus propiedades no son necesariamente las mismas. Tradicionalmente se asume que ambos canales son funcionalmente idénticos, pero nadie lo ha comprobado con el cuidado necesario para validar la construcción de modelos estructurales tan detallados como los del estado desactivado del DSV.

Justificación

Aunque las propiedades biofísicas de los canales Kv han sido examinadas meticulosamente por décadas, la mayor parte de la información ha sido recaudada usando al canal *Shaker* como modelo. Cuando se publicó la estructura de Kv1.2, los autores del trabajo tuvieron cuidado de mencionar que Kv1.2 es sumamente parecido a *Shaker* (48% de identidad global, 100% en la región del S4), y de realizar posteriormente algunos experimentos electrofisiológicos que comprueban que Kv1.2 es un clásico canal de potasio activado por despolarización [51]. Estos argumentos fueron suficientes para que las nuevas investigaciones de la detección del voltaje compararan los datos funcionales de *Shaker* con la estructura de Kv1.2, sin reparar en la necesidad de una validación rigurosa de la similitud de las propiedades de ambos canales. En este trabajo no se condena de ninguna manera el uso de la estructura de Kv1.2 para la interpretación cualitativa de las observaciones electrofisiológicas en otros canales Kv. Después de todo, Kv1.2 es prácticamente igual a *Shaker* si solamente se evalúan sus propiedades macroscópicas de manera superficial [51, 52]. El problema surge cuando se realizan estimaciones precisas, con una resolución de ångstroms, del movimiento del S4 durante la activación del DSV mediante estudios computacionales. Dado que no se ha resuelto la estructura de un DSV desactivado y las propiedades biofísicas de Kv1.2 no han sido analizadas, las simulaciones de dinámica molecular están guiadas únicamente por datos de una proteína diferente, *Shaker*, para definir el estado inicial del S4.

La premisa de este trabajo es que una simulación tan detallada exige datos funcionales igualmente meticulosos, o al menos una prueba experimental de que Kv1.2 es idéntico a *Shaker* en los aspectos más fundamentales de la detección del voltaje. Ensayos preliminares revelaron que la sensibilidad al voltaje en Kv1.2 es significativamente menor que la de *Shaker*, y se decidió evaluar con más detalle las diferencias entre el movimiento de carga de ambos canales.

Objetivo general

Medir la carga de apertura de Kv1.2 y determinar si es igual a la de *Shaker*.

Objetivos particulares

- Describir las propiedades de las corrientes macroscópicas de Kv1.2.
- Establecer la causa de la discrepancia entre mediciones de Kv1.2 y de *Shaker*.

Capítulo II

Métodos

II.1. Biología molecular y expresión heteróloga de Kv1.2

El plásmido Kv1.2-pMAX nos fue proporcionado por el Dr. Benoît Roux (Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular, Universidad de Chicago). El DNA fue linearizado con PacI y transcrito in vitro con el kit de RNA polimerasa T7 mMACHINE de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ambion).

Para probar múltiples hipótesis a lo largo de la realización de este trabajo, se construyó una variedad de canales Kv1.2 mutantes. La Tabla II.1 resume la posición de la mutación, la región del canal que modifica y si es posible registrar corriente cuando se inyecta mRNA a ovocitos de la rana *Xenopus laevis*:

Mutante	Región modificada	Expresión
W366F	Poros	Sí
W366Y	Poros	Sí
V410F	Poros	No
V410Y	Poros	No
V410W	Poros	No
R294M (R1M)	S4	No
R294C (R1C)	S4	No
R294Q (R1Q)	S4	Sí
R297Q (R2Q)	S4	Sí
R300Q (R3Q)	S4	No
R300M (R3M)	S4	No
R300N (R3N)	S4	Sí
R300S (R3S)	S4	No

R300T (R3T)	S4	No
R303Q (R4Q)	S4	Sí
K306T (K5T)	S4	No
K306S (K5S)	S4	No
K306A (K5A)	S4	No
K306G (K5G)	S4	No
K306M (K5M)	S4	No
R309Q (R6Q)	S4	No
R309T (R6T)	S4	No
Kv1.2 Δ (273-285)/ <i>Shaker</i> (332-353)	<i>linker</i> S3-S4	No

Tabla II.1: Mutaciones en Kv1.2. El nombre entre paréntesis de las mutantes del S4 hace referencia al orden de las cargas positivas en el S4.

Las mutaciones en el poro fueron realizadas mediante el método de PCR de dos pasos [53] con la enzima Platinum Pfx (Invitrogen). El resto de las mutantes se construyeron en un solo paso usando la polimerasa KOD (Novagen). Los oligonucleótidos mutagénicos también realizan una sustitución sinónima en el DNA de la mutante para permitir su diagnóstico por restricción, y las clonas positivas fueron verificadas por secuenciación. Todas las enzimas de restricción fueron compradas a New England Biolabs.

La expresión heteróloga de canales fue llevada a cabo en ovocitos de *Xenopus laevis*. Una sección de ovario fue extraída quirúrgicamente y defoliculada con colagenasa tipo I (Sigma Aldrich) a una concentración de 1.2mg/ml en solución OR2 (Tabla II.2). Posteriormente, las células fueron almacenadas a 18°C en solución ND96 (Tabla II.2). Entre 5 y 24 horas después de la colecta, ovocitos de etapas V-VI fueron inyectados con 30-60 nl de mRNA 0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo de uno a tres días después de la inyección.

OR2	ND96
82.5 mM NaCl	96 mM NaCl
2 mM KCl	2 mM KCl
1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂
5 mM HEPES	1.8 mM CaCl ₂
pH 7.5 (NaOH)	5 mM HEPES
	2.5 μM ácido pirúvico
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina
	pH 7.5 (NaOH)

Tabla II.2: Soluciones para colecta y almacenaje de ovocitos de *Xenopus laevis*.

II.2. Electrofisiología

II.2.1. Fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*)

La técnica por excelencia para estudiar la actividad de los canales iónicos es la fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch-clamp*. El *patch-clamp* permite medir el paso de carga a través de la membrana con una resolución extraordinaria, en el orden de 10^{-3} segundos y 10^{-12} amperes, y ha sido una herramienta invaluable para el estudio de la fisiología de las membranas celulares desde su invención en 1981 [54].

Brevemente, la fijación de voltaje consiste en mantener el potencial de membrana en un valor fijo al inyectar corriente que compensa rápidamente cualquier cambio causado por el flujo de iones a través de los canales. Para hacer *patch-clamp*, se presiona una micropipeta de vidrio que contiene un electrodo, típicamente de Ag–AgCl, contra la membrana de la célula. Los lípidos de la membrana se adhieren al vidrio, formando un sello de alta resistencia ($\gtrsim 1 \text{ G}\Omega$) entre la solución de la pipeta y la solución intracelular, que es eléctricamente continua con la solución del baño. Una vez formado el gigasello, se pueden medir cambios en el potencial de membrana y compensarlos rápidamente usando un amplificador. La corriente que se tiene que inyectar para mantener el voltaje constante es del signo opuesto a la corriente que está fluyendo a través de los canales del parche, pero como es de la misma magnitud, es una medida de cuánta corriente está pasando a través de la membrana que forma el gigasello. La corriente de compensación se amplifica y es lo que se registra durante un experimento de *patch-clamp*.

Hay cuatro distintas configuraciones de *patch-clamp*, y la que se use depende de la naturaleza del experimento que se quiera llevar a cabo. Todas empiezan de la manera que fue descrita en el párrafo anterior, formando un gigasello entre la membrana y una pipeta de vidrio. Esta es la configuración más simple, llamada *on-cell* o *cell-attached* (Figura II.1 A). El gigasello es tan estable que puede escindirse de la célula, de esta manera, el experimentador tiene control total sobre la solución intracelular y puede cambiarla rápidamente. A esta técnica se le conoce como *inside-out* (Figura II.1 C). Alternativamente, la membrana del gigasello puede romperse aplicando succión para obtener acceso eléctrico a la célula completa (Figura II.1 B), esta es la configuración *whole cell*. También es posible exponer la cara extracelular de la membrana a la solución del baño (*outside-out*, Figura II.1 D) separando la pipeta de la célula en modo *whole-cell*.

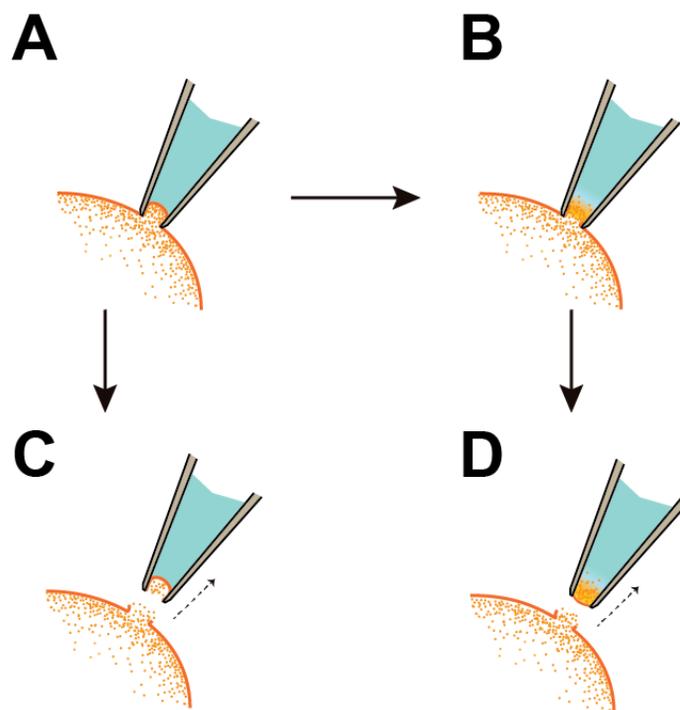


Figura II.1: Configuraciones de *patch-clamp*. (A) *On-cell* o *cell-attached*. (B) *Whole-cell*. (C) *Inside-out*. (D) *Outside-out*.

II.2.2. Adquisición y análisis de datos

Todos los experimentos descritos en este reporte fueron realizados con la técnica de *patch-clamp* en la configuración *on-cell* excepto donde es indicado lo contrario. Los registros de corriente fueron adquiridos con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices) y los programas Pulse y Patchmaster (ambos de HEKA Elektronik). Los trazos de corriente fueron filtrados, muestreados y separados de la corriente de fuga de acuerdo al tipo de experimento realizado, como es indicado en la Tabla II.3:

Experimento	Filtro paso bajo	Frecuencia de muestreo	Sustracción
Curva conductancia-voltaje	5 kHz	20 kHz	-P/5
Análisis de varianza	10 kHz	100 kHz	—
Pendiente límite	5kHz	15 kHz	manual
Corrientes de compuerta	10 kHz	50 kHz	-P/5
Carga por canal	10 kHz	100 kHz	—
Rampas de voltaje	5 kHz	10 kHz	manual

Tabla II.3: Procesamiento de la señal de corriente.

Todos los registros fueron analizados con códigos escritos en nuestro laboratorio usando el software Igor Pro 6 (Wavemetrics).

Curvas de conductancia-voltaje

Se aplicaron pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -90 mV hasta 70 mV en incrementos de 10 mV (pulso de prueba), posteriormente se regresó el potencial de membrana a -90 mV (corriente de cola). La corriente de cola está relacionada con la conductancia macroscópica G de acuerdo a las siguientes consideraciones:

La corriente macroscópica I que se observa durante un registro electrofisiológico depende del número de canales en el parche (N), la probabilidad de que estén abiertos (P_o), la conductancia de cada uno de ellos (g) y la fuerza impulsora, que es la diferencia entre el voltaje del pulso y el potencial de inversión ($V - V_{rev}$). La conductancia macroscópica engloba todos estos términos excepto la fuerza impulsora:

$$G = NP_o g \quad (\text{II.1})$$

$$I = G(V - V_{rev}) \quad (\text{II.2})$$

Inmediatamente después de hiperpolarizar la membrana, los canales no han tenido suficiente tiempo para cambiar de conformación y por lo tanto la probabilidad de apertura P_o al principio de la corriente de cola es la misma que en el pulso de prueba, pero la fuerza impulsora $V - V_{rev}$ sí cambia inmediatamente. Si la fuerza impulsora es constante entre pulsos, I es directamente proporcional a G , y al normalizar la amplitud de la corriente de cola se obtiene la fracción de la conductancia que se activa con cada pulso de voltaje.

La amplitud de la corriente de cola durante los primeros 40 μ s del pulso hiperpolarizante fue normalizada y graficada contra el voltaje al cual se estimuló la membrana durante el pulso de prueba. La curva fue ajustada con la ecuación

$$P(V) = P_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{\frac{-q}{kT(V-V^*)}}} \right]^4 \quad (\text{II.3})$$

donde $P(V)$ representa la probabilidad de apertura en función del voltaje, P_{max} la probabilidad de apertura máxima, k la constante de Boltzmann, T la temperatura en K, V^* una variable relacionada con la posición de la curva en el eje del voltaje y q la carga asociada al

paso del estado cerrado al abierto por subunidad. La ecuación de Boltzmann (II.3) asume que un canal solamente puede encontrarse en dos estados, cerrado o abierto, y describe la probabilidad de encontrar al ensamble de canales en el estado abierto en términos de la energía de la transición. La ecuación II.3 está elevada a la cuarta potencia para representar que cada subunidad del tetrámero lleva a cabo, de manera independiente, el mismo cambio conformacional que causa la apertura.

Análisis de ruido no estacionario

Una manera de contar el número de canales presentes en un experimento electrofisiológico es usando análisis de ruido no estacionario. Para canales que 1. Sólo pueden existir en un estado conductivo o no conductivo, 2. Cuya activación es independiente de la actividad de otros canales en el parche y 3. Que constituyen una población homogénea, la varianza σ^2 de la corriente macroscópica promedio $\langle I \rangle$ y el número de canales N está relacionada a través de la expresión

$$\sigma^2 = i \langle I \rangle - \frac{\langle I^2 \rangle}{N} \quad (\text{II.4})$$

La ecuación II.4 es derivada a partir de expresiones que declaran que la activación de un solo canal es descrita por una distribución binomial, y que la varianza de la activación de un solo canal se multiplica N veces para obtener la varianza de la corriente macroscópica. En resumen, es posible estimar el número de canales en un experimento a través de la varianza de la corriente macroscópica [55, 13].

Experimentalmente, se pulsa la membrana al mismo voltaje (50 y -90 mV en este trabajo) $\gtrsim 100$ veces, y se promedian los trazos de corriente para obtener la corriente macroscópica promedio. Posteriormente, se resta $\langle I \rangle$ de cada trazo de corriente para producir trazos de fluctuaciones. La varianza es calculada en cada punto del curso temporal de los trazos de fluctuaciones y graficada en función de $\langle I \rangle$. Presentados de esta manera, los datos tienen la forma de una parábola que puede ser ajustada con la ecuación II.4. El máximo de la parábola está ubicado en el valor de I donde la probabilidad de que un canal esté abierto (o cerrado, porque es una distribución binomial) es igual a 0.5. La pendiente de los puntos más cercanos a $\langle I \rangle = 0$ (y por lo tanto, $P_o \approx 0$) representa la corriente unitaria i . La parábola tiene dos raíces: la primera es donde $\langle I \rangle = 0$, y la segunda es donde $\langle I \rangle = iN$ (cuando $P_o = 0$ y 1, respectivamente). El programa que ajusta los datos hace uso de la segunda raíz y el valor de i para estimar el número de canales en el parche.

Pendiente límite

En 1978, Almers propuso que para un canal que se activa con despolarización, la sensibilidad al potencial es máxima y depende exponencialmente en el voltaje cuando $V \rightarrow -\infty$, y consecuentemente, la probabilidad de apertura $P_o \rightarrow 0$ [30]. El razonamiento detrás de esta idea es que para un canal con un modelo de activación secuencial

$$C_1 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C_2 \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} C_3 \dots C_n \xrightleftharpoons[k_c]{k_o} O \quad (\text{II.5})$$

la única forma de medir la carga asociada a todas las transiciones k es asegurándose de que el estado inicial de todos los canales sea el primer estado cerrado C_1 , poblado preferencialmente cuando el voltaje es muy negativo. De esta manera, cuando se mide la probabilidad de apertura, el experimentador puede estar seguro de que cada canal que se abra recorrió la totalidad de la vía de activación y desplazó la carga asociada a cada transición.

En otras palabras, lo que la *teoría de la sensibilidad logarítmica al potencial* significa es que es posible medir la carga de apertura aparente q_a mediante la dependencia de P_o en el voltaje a potenciales muy negativos. En el rango de voltaje donde P_o es $< 10^{-3}$, P_o depende exponencialmente en V y está relacionada a q_a por la expresión

$$P_o = A e^{q_a V / kT} \quad (\text{II.6})$$

donde A es una constante sin significado físico (en este modelo) que ajusta la escala de la exponencial, k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura en K. A este método de determinación de la carga de apertura aparente se le conoce como *pendiente límite*. Es importante recalcar que q_a solamente representa la carga de apertura física si no hay movimiento de carga fuera de la vía de activación, y para que eso sea cierto la vía tiene que cumplir con los siguientes requisitos: 1. Tener un solo estado abierto, o de haber más, que no haya movimiento de carga en las transiciones que los comunican, 2. Que no haya ramificaciones de la vía que sean dependientes del voltaje, y 3. Que no haya estados cerrados posteriores al estado abierto [33].

La probabilidad de apertura está relacionada con la magnitud de la corriente macroscópica I a través de la ecuación

$$I = NP_o i \quad (\text{II.7})$$

donde i es la amplitud de la corriente de un solo canal y N es el número de canales. Experimentalmente, una $P_o < 10^{-3}$ implica que la corriente macroscópica en un parche de membrana típico es prácticamente indetectable. Sin embargo, es posible medir NP_o mediante la observación de aperturas de canales únicos: si se registra la actividad unitaria de los canales por un tiempo suficientemente largo, se puede hacer un ensamble de los trazos de corriente y reconstruir un curso temporal de activación comparable con el resto de las observaciones macroscópicas, correspondiente al valor de la expresión NP_o . La probabilidad de apertura puede ser separada de N mediante análisis de varianza (ver II.2.2, *Análisis de varianza*).

En este trabajo se midió la probabilidad de apertura como fue descrito en el párrafo anterior. En el rango de voltaje 30 – -45 mV (donde $P_o \gtrsim 10^{-1}$), se determinó P_o a través de corrientes de cola y análisis de fluctuaciones. Para el resto de las mediciones de P_o , la membrana fue despolarizada 100-1000 veces desde -100 mV hasta el voltaje de prueba, que abarca el rango -50 – -90 mV en escalones de 5 mV, y regresada al potencial de mantenimiento. La duración de cada pulso de prueba fue de 600 ms. La corriente de fuga fue restada manualmente de cada trazo de corriente usando un promedio de trazos sin aperturas. Los trazos sustraídos se idealizaron como en [56], donde se mide la amplitud de la corriente unitaria i y se define un umbral $U = i/2$. Si la corriente en un punto dado es mayor que U , la idealización define ese punto como 1 (“canal abierto”), y si es menor que U lo define como 0 (“canal cerrado”). El programa tiene más de un umbral para permitir la evaluación de aperturas simultáneas. La suma de las idealizaciones dividida entre el número de trazos analizados representa el curso temporal de NP_o . El valor absoluto de NP_o fue determinado a partir del valor promedio de la curva de activación una vez que alcanza el estado estacionario, y dividido entre el número de canales N estimado por análisis de varianza en el mismo parche para obtener la probabilidad de apertura. P_o fue graficada en función del voltaje, y la carga de apertura aparente se obtuvo a través del ajuste de la ecuación II.6 en el rango $10^{-3} - 10^{-7}$ de P_o .

Curvas de carga-voltaje

Se midieron corrientes de compuerta para evaluar directamente la translocación de las cargas del S4. Dado que las corrientes de compuerta son indetectables en presencia de corriente iónica a través del poro, se usaron soluciones libres de iones permeantes durante estos experimentos.

Se aplicaron pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de -90 mV hasta 50 mV en incrementos de 10 mV (pulso de prueba), posteriormente se regresó el potencial de membrana a -90 mV. A diferencia de las corrientes iónicas, las corrientes de compuerta son transitorias porque el movimiento del S4 es limitado. Las corrientes durante la despolarización (corrientes de activación/*on currents*) fueron integradas y el valor de carga obtenido se graficó contra el voltaje al cual se estimuló la membrana.

Carga por canal

Es posible medir corrientes iónicas y de compuerta en el mismo gigasello usando soluciones de Cs⁺, un catión que permea ~20 veces menos que K⁺ a través del poro de los canales Kv [57, 58]. Para realizar esta clase de experimentos, se usaron soluciones simétricas donde Cs⁺ es el único ion permeante.

La membrana fue estimulada al potencial de inversión (alrededor de 0 mV) para obtener un trazo de corriente de compuerta, libre de corriente iónica. La corriente se integró para obtener el valor de la carga desplazada por la activación de todos los canales presentes en el gigasello. En el mismo experimento, se obtuvieron registros de corriente iónica pulsando la membrana de 300 a 600 veces desde un potencial de mantenimiento de -90 mV hasta 50 mV y de vuelta a -90 mV. Las fluctuaciones de la corriente fueron usadas para calcular N como fue descrito anteriormente. El valor de la carga máxima fue graficado contra el número de canales presentes en el mismo gigasello. La pendiente de un ajuste lineal entre experimentos representa el movimiento de carga asociada a la activación de un solo canal.

Rampas de voltaje

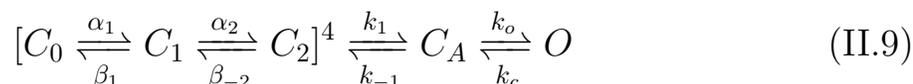
Una rampa de voltaje que asciende a 50 mV desde -100 mV en 5 s fue aplicada al gigasello. Para eliminar el componente de corriente de fuga, se determinó la pendiente de la corriente en la región lineal entre -100 y -90 mV y se restó una línea con la misma pendiente al trazo entero. La corriente sustraída fue convertida a conductancia dividiendola entre el voltaje, normalizada al valor de la conductancia en el estado estacionario y ajustada con la ecuación

$$Ae^{qV/kT} \quad (\text{II.8})$$

en el rango de conductancia normalizada $10^{-2} - 10^{-3}$ para obtener la carga. Los parámetros de la Ecuación II.8 tienen el mismo significado que en la ecuación II.6.

Modelo cinético

Se utilizó el modelo propuesto por Ledwell y Aldrich [59], que postula dos transiciones independientes entre estados cerrados por cada una de las cuatro subunidades. Una vez que todas las subunidades han atravesado las dos transiciones, se alcanza un estado cerrado que tiene todos los DSVs activados. El estado cerrado-activado precede al estado abierto:



Se escribieron las ecuaciones diferenciales que describen el cambio de concentración de cada estado y se integraron usando el método de Runge-Kutta en Igor Pro. La ocupancia del estado abierto se graficó en contra del tiempo para reconstruir los cursos temporales de las corrientes iónicas macroscópicas a cada voltaje experimental. A cada transición se le asignó cierta carga, de tal manera que el movimiento entre estados en el modelo reconstruye las corrientes de compuerta. El valor de cada constante de velocidad se asignó arbitrariamente buscando el mejor ajuste de los datos. La concordancia del modelo con las corrientes se evaluó visualmente, y el conjunto de constantes de velocidad y carga que reproducen más fielmente la cinética de los datos es el que se presenta en esta tesis.

II.2.3. Soluciones

Curvas de conductancia-voltaje, pendiente límite y rampas de voltaje:

Intracelular	Extracelular
130 mM KCl	130 mM KCl
3 mM HEPES	3 mM HEPES
1 mM EDTA	1.8 mM CaCl ₂
pH 7.4 (KOH)	pH 7.4 (KOH)

Soluciones para medir inactivación tipo C en Kv1.2:

Intracelular	Extracelular	
	TEA	Bajo K⁺
100 mM KCl	100 mM KCl	10 mM KCl
30 mM NaCl	30 mM TEACl	120 mM NaCl
3 mM HEPES	3 mM HEPES	3 mM HEPES
1 mM EDTA	1.5 mM CaCl ₂	1.5 mM CaCl ₂
pH 7.4 (KOH)	pH 7.4 (KOH)	pH 7.4 (NaOH)

Corrientes de compuerta:

Intracelular	Extracelular
130 mM NMDG-Asp	130 mM NMDG-Asp
10 mM HEPES	10 mM HEPES
5 mM NaCl	5 mM NaCl
2.5 mM EDTA	2.5 mM CaCl ₂
pH 7.4 (NMDG)	pH 7.4 (NMDG)

Carga total por canal:

Intracelular	Extracelular
120 mM CsCl	120 mM CsCl
10 mM HEPES	10 mM HEPES
1.5 mM EDTA	1.5 mM CaCl ₂
pH 7.4 (NMDG)	pH 7.4 (NMDG)

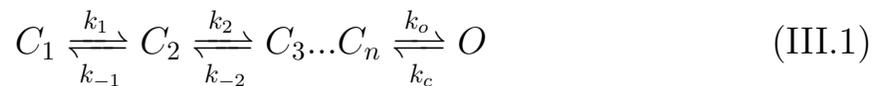
Capítulo III

Resultados

III.1. Propiedades de la corriente macroscópica de Kv1.2

Se empezó este estudio con una caracterización breve de las propiedades macroscópicas de Kv1.2. Algunos trabajos habían mostrado que Kv1.2 es un clásico canal de potasio activado por voltaje que tiene muchas similitudes con *Shaker*: alta sensibilidad a los cambios en el potencial transmembranal, una cinética de activación, desactivación e inactivación tipo C comparable y afinidad por charybdotoxina, un péptido presente en el veneno del escorpión *L. quinquestriatus* [51, 52], así como la secuencia de selectividad clásica de un canal de K⁺ muy similar a la de *Shaker* [58, 57]. Los resultados de esta sección añaden algunas propiedades a esa lista. Las constante de tiempo de activación, desactivación y retraso de la activación dependen fuertemente en el voltaje, aunque notablemente, la activación es más lenta que en *Shaker* a todos los voltajes probados ([60, 31]) (Figura III.1 B). La cinética de activación es sigmoideal, indicativo de múltiples estados cerrados, mientras que la cinética de desactivación es monoexponencial, sugerente de un solo estado abierto.

El retraso está relacionado con las transiciones entre múltiples estados cerrados, mientras que la constante de tiempo de la activación refleja las propiedades del paso limitante de la vía de activación. En Kv1.2, el retraso siempre es más rápido que la constante de tiempo de activación, lo cual sugiere que la transición limitante es la última en la vía, la de apertura (k_o en el esquema III.1).



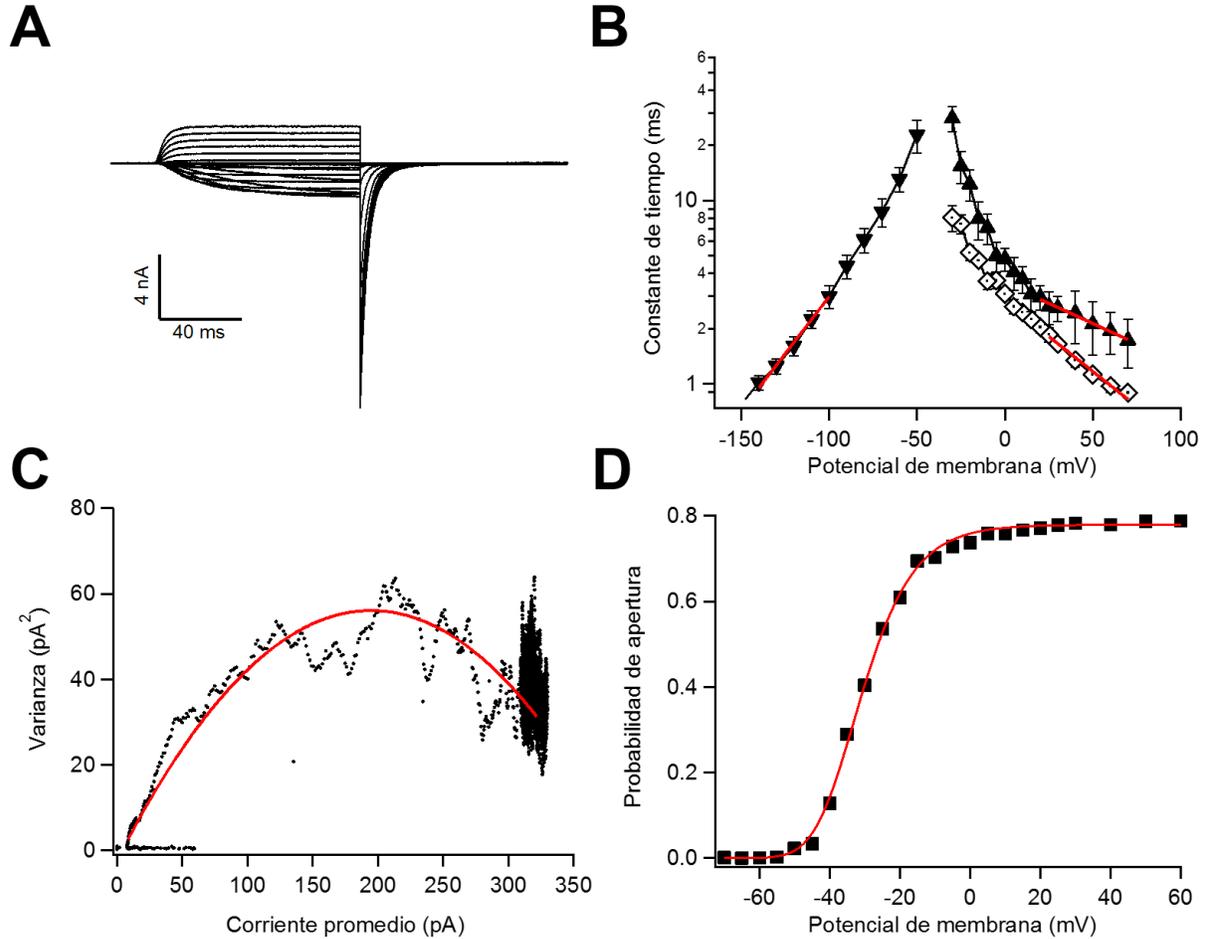


Figura III.1: Las propiedades de las corrientes macroscópicas de Kv1.2 son muy similares a las de Shaker. (A) Familia de trazos de corriente de un experimento representativo. El pulso activador va desde -70 mV hasta 30 mV en incrementos de 10 mV, seguido de un pulso hiperpolarizante a -90 mV. (B) Constantes de tiempo de la activación (triángulos), desactivación (triángulos invertidos) y retraso de la activación (rombos). Se ajustó la ecuación exponencial $\tau(V) = \tau_0 e^{qV/kT}$ (línea roja) a los cinco puntos extremos de la curva de cada constante de tiempo para obtener la carga asociada a ella. $q_{act} = 0.25 e_0$, $q_{deact} = 0.72 e_0$, $q_{retraso} = 0.45 e_0$. (C) Varianza de la corriente macroscópica en un experimento representativo. El número de canales N y la corriente unitaria i (650 y 0.7 pA a 40 mV en este parche) fueron estimados a partir del ajuste de la ecuación $\sigma^2 = iI - I^2/N$, y se obtuvo la probabilidad de apertura máxima (0.8) mediante la expresión $P_{max} = I/Ni$. (D) Curva de probabilidad de apertura-voltaje. La línea roja es un ajuste a la ecuación $P(V) = P_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{\frac{-q}{kT}(V - V^*)}} \right]^4$, $V^* = -45$ mV, $q = 2.7 e_0$.

El análisis de varianza, como es descrito en la sección II.2.2, permite estimar el número de canales N y la corriente unitaria i a través de las fluctuaciones de la activación o desactivación de la corriente iónica. Conociendo esos parámetros, es posible calcular la probabilidad de apertura máxima P_{max} mediante la expresión $I = iNP_{max}$, válida cuando se activa la corriente con un pulso de voltaje igual o mayor al necesario para saturar la curva de conductancia-voltaje. La Figura III.1 C muestra la varianza de la corriente de activación en un experimento típico. P_{max} en Kv1.2 es 0.8, idéntica a la de *Shaker*. La curva de conductancia-voltaje fue normalizada a este valor para producir una curva de P_o -voltaje (Figura III.1 D).

III.2. Mutaciones en el poro de Kv1.2

Después de describir las corrientes iónicas, se pretendió medir corrientes de compuerta para continuar con la caracterización de las propiedades macroscópicas de Kv1.2. Dado que las corrientes de compuerta son minúsculas comparadas con las corrientes iónicas ($\sim 10^3$ veces más pequeñas) y sus cursos temporales se sobrelapan parcialmente, es imposible analizar las características de las corrientes de compuerta cuando fluye corriente iónica al mismo tiempo. Existen múltiples soluciones para este problema, y la primera que se decidió aplicar fue modificar el dominio de poro. Se han descrito algunas mutaciones en *Shaker* que impiden la conducción iónica pero dejan intactas otras propiedades, como la detección del voltaje. Tener una herramienta así eliminaría la necesidad de perfundir el gigasello con bloqueadores del poro o registrar en ausencia de iones permeantes, que puede tener efectos indeseados sobre las propiedades del canal.

Una de las mutantes mencionadas arriba es *Shaker* W434F [61], no es conductiva porque la inactivación tipo C se acelera a tal grado que la conformación preferencial del canal es el estado inactivado [62]. De acuerdo a esta información, se construyó la mutante análoga Kv1.2 W366F. Se encontró que W366F conduce suficiente corriente iónica para hacerla inútil para nuestro propósito, pero dicha corriente tiene una cinética notablemente diferente a la del canal silvestre (Figura III.2 A). Conociendo las propiedades de *Shaker* W434F, lo más probable era que el decaimiento de la corriente en Kv1.2 W366F fuera causado por inactivación tipo C. Para probar esta hipótesis, se registró a la mutante en soluciones de bajo K^+ extracelular, condición que se sabe que acelera la inactivación tipo C [63, 64], que fue lo que sucedió en W366F (Figura III.2 B). Otra característica de la inactivación tipo C es que se hace más lenta cuando se aplica tetraetilamonio (TEA), un bloqueador del poro de los canales de K^+ , a la cara extracelular de la membrana. Se midió la velocidad de inactivación

antes y después de perfundir un parche *outside-out* con TEA, y se encontró que se hacía más lenta (Figura III.2 B). El comportamiento de la inactivación de Kv1.2 W366F en ambas condiciones es consistente con la hipótesis de que es tipo C, como en *Shaker*, pero no lo suficientemente rápida para impedir la conducción iónica.

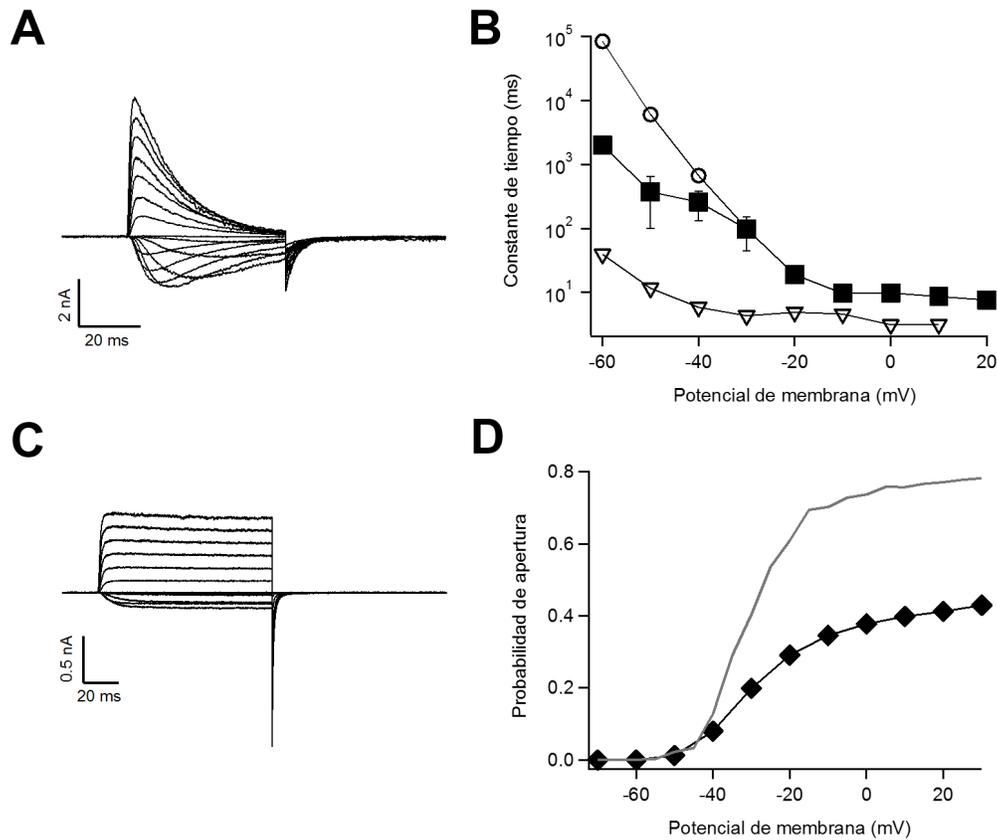


Figura III.2: Las mutaciones W366F y W366Y en Kv1.2 no eliminan la conducción iónica. (A) Familia de trazos de corriente de W366F. El pulso de voltaje que activa las corrientes mostradas aquí va de -70 mV hasta 70 mV en incrementos de 10 mV, seguido de un pulso hiperpolarizante a -90 mV. (B) Constantes de tiempo de la inactivación en alto K⁺ (cuadrados negros), bajo K⁺ extracelular (triángulos invertidos) y 30 mM TEA extracelular (círculos). Sólo se cuenta con un experimento en ambas condiciones de prueba. (C) Familia de trazos de corriente de W366Y. El pulso de voltaje que activa las corrientes mostradas aquí va de -70 mV hasta 60 mV en incrementos de 10 mV, seguido de un pulso hiperpolarizante a -90 mV. (D) Curva de probabilidad de apertura-voltaje. La línea roja es un ajuste a la ecuación $P(V) = P_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{\frac{-q}{kT}(V - V^*)}} \right]^4$, $V^* = -49$ mV, $q = 2 e_0$. La curva de P_o del canal silvestre (línea gris) se muestra para comparación.

Sabiendo que era posible que Kv1.2 W366F no fuera idéntica a *Shaker*, se construyó la mutante W366Y al mismo tiempo. Esta mutante es notablemente similar a Kv1.2 silvestre, con la diferencia de que la velocidad de desactivación es mayor y consecuentemente la

probabilidad de apertura máxima es menor (Figuras III.2 C y D).

Dado que los intentos de obtener un canal no conductivo a partir de sustituciones en la posición 366 no fueron exitosos, se construyeron tres mutantes más, esta vez de la valina 410. V410 de Kv1.2 equivale a V478 en *Shaker*, y al sustituir V478 por un aminoácido aromático, se forma un “sello hidrofóbico” cerca de la compuerta de activación que estabiliza tanto el estado cerrado del poro que prácticamente nunca se abre [65, 66]. Se mutó V410 de Kv1.2 a Trp, Phe y Tyr con la intención de obtener canales no conductivos, pero no fue posible observar ningún tipo de corriente iónica o de compuerta- por *patch-clamp*.

III.3. Corrientes de compuerta de Kv1.2

A falta de una mutante no conductiva, se midieron las corrientes de compuerta de Kv1.2 usando soluciones libres de iones permeantes (Figura III.3 A). Las corrientes de activación fueron integradas y normalizadas para construir la curva de carga-voltaje (Figura III.3 B), y ajustadas con una suma de dos ecuaciones de Boltzmann para representar que el movimiento de carga es asimétrico entre las transiciones iniciales y finales.

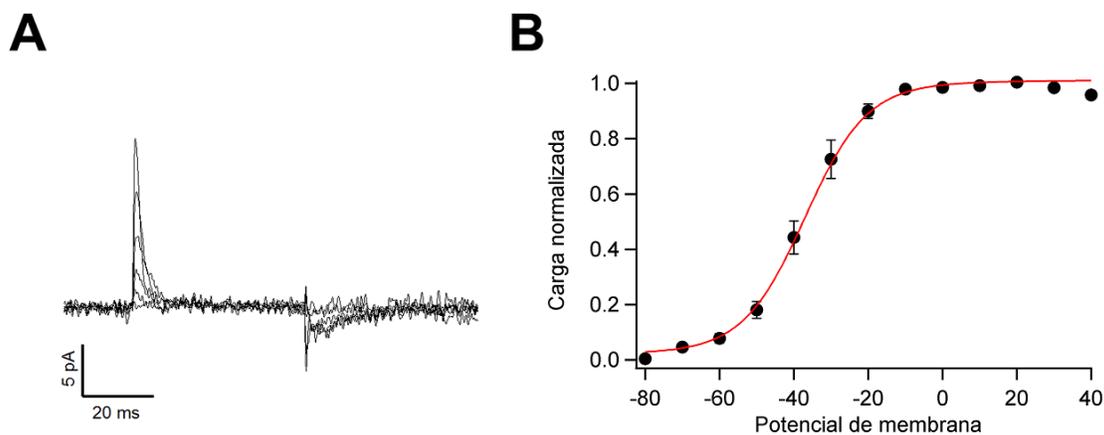


Figura III.3: Corrientes de compuerta de Kv1.2. (A) Trazos representativos de corrientes de compuerta. Se pulsó la membrana desde -50 mV a 40mV en cada 10 mV, potencial de desactivación = -90 mV. (B) Curva de carga-voltaje. La línea roja corresponde a un ajuste a la suma de dos ecuaciones de Boltzmann $P(V) = \frac{P_{max1}}{1+e^{\frac{-q_1}{kT}(V-V_1^*)}} + \frac{P_{max2}}{1+e^{\frac{-q_2}{kT}(V-V_2^*)}}$, $V_1^* = -70$ mV, $q_1 = 0.3 e_0$, $V_2^* = -37$ mV, $q_2 = 3 e_0$.

La relación entre el movimiento de carga y el voltaje indica que la totalidad de los VSDs presentes en el gigasello se encuentran activados a potenciales más positivos que -10 mV, donde la curva alcanza el estado estacionario.

III.4. Modelo cinético de las corrientes macroscópicas de Kv1.2

Se construyó un modelo de la activación del canal que reproduce nuestras observaciones macroscópicas (Figura III.4, esquema en II.9). El modelo simula dos transiciones entre estados cerrados por cada subunidad del tetrámero, donde se lleva a cabo el movimiento de la mayor parte de carga, seguidas por una transición poco voltaje-dependiente hacia un estado abierto único.

Los parámetros de las constantes de velocidad usadas se listan en la Tabla III.1. El modelo que se usó fue propuesto con anterioridad para explicar el comportamiento de *Shaker*, y ajusta muy adecuadamente la cinética de las corrientes macroscópicas de Kv1.2. El modelo indica que una de las primeras transiciones entre estados cerrados es la más dependiente en el voltaje al tener la mayor carga asociada a sus constantes de velocidad. Es notable que se logre reproducir la cinética de Kv1.2 usando parámetros muy similares a *Shaker* excepto por la magnitud de las constantes de velocidad – las constantes que llevan hacia el estado abierto fueron reducidas y las que llevan hacia estados cerrados fueron aumentadas [59]. Esto sugiere que es más difícil responder a una despolarización en Kv1.2 que en *Shaker*.

Dado que no estaba dentro de los objetivos caracterizar exhaustivamente las propiedades macroscópicas del canal, sino la carga de apertura, no se realizaron muchos de los experimentos que se han utilizado para evaluar modelos mucho más detallados e informativos [67, 68]. Sin embargo, es evidente que el mecanismo de activación de Kv1.2 debe ser muy similar al de *Shaker*, ya que se puede ajustar usando los mismos modelos.

Constante	Valor a 0 mV (s ⁻¹)		Carga (e ₀)	
	Kv1.2	Shaker [59]	Kv1.2	Shaker [59]
α_1	520	1120	0.4	0.2
β_1	1000	373	-0.6	-1.6
α_2	1900	2800	0.8	0.3
β_2	60	21.2	-0.7	-0.1
k_1	400	—	0.2	—
k_{-1}	100	—	-0.6	—
k_o	1100	3000	0.05	0.1
k_c	400	250	-0.2	-0.3

Tabla III.1: Valores de las constantes de velocidad usadas para reproducir los datos experimentales.

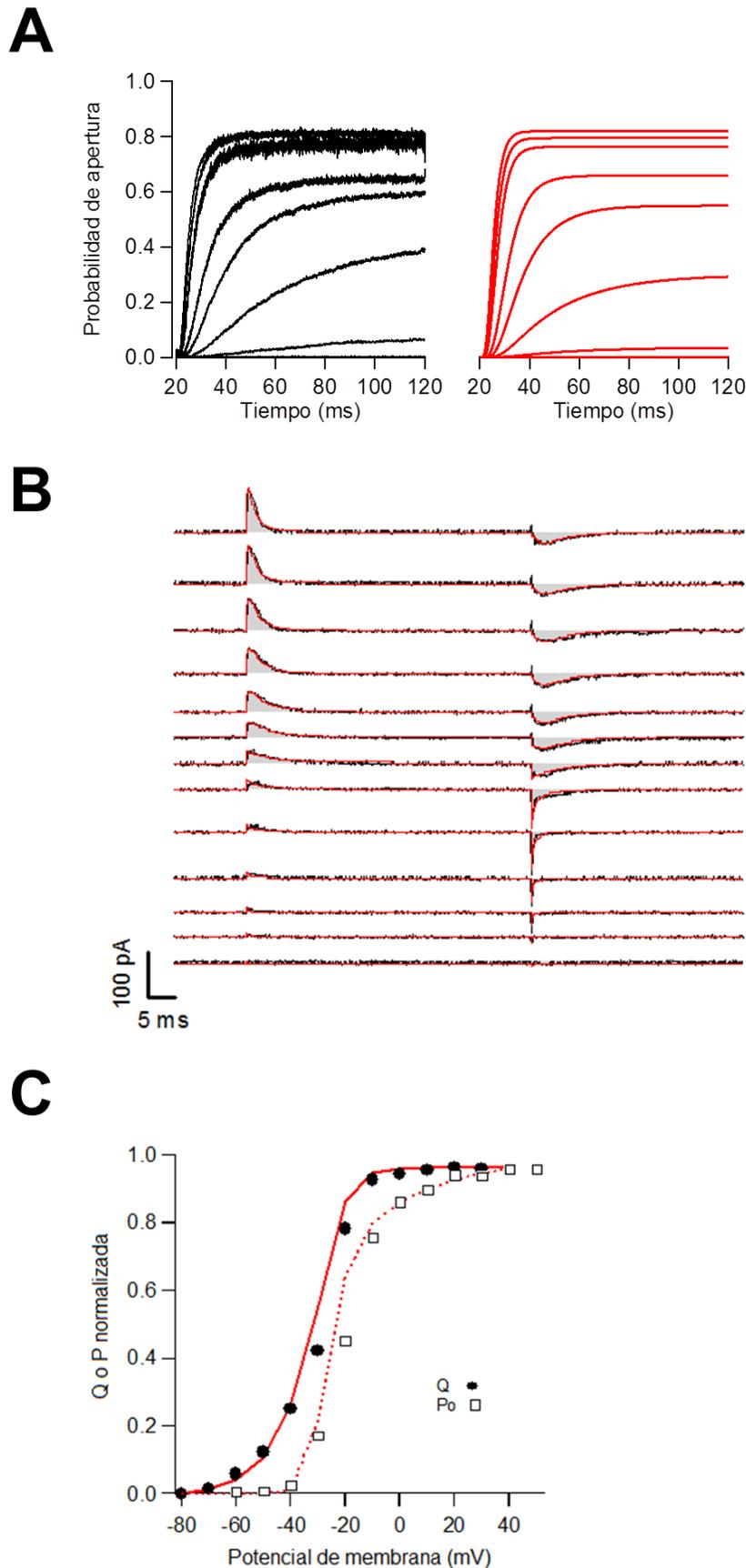


Figura III.4: Un modelo cinético propuesto para *Shaker* ajusta las corrientes macroscópicas de Kv1.2. Los trazos negros corresponden a los datos experimentales y los rojos a la simulación hecha con el modelo. (A) Corrientes iónicas de activación. (B) Corrientes de compuerta. El área gris es la integral de la corriente. (C) Curvas de carga (círculos negros) y conductancia (cuadros blancos) en función del voltaje. La línea roja continua es la predicción del modelo para la carga, la línea punteada predice la conductancia.

III.5. Medición de la carga de apertura aparente: Pendiente límite

A primera vista, Kv1.2 se parece tanto a *Shaker* que no hay razón para sospechar que podría tener una sensibilidad diferente al voltaje. Sin embargo, cuando se midió la carga de apertura aparente por el método de la pendiente límite, se encontró que Kv1.2 desplaza $10.2 \pm 0.45 e_0$ desde el primer estado cerrado de la vía de activación hasta el estado abierto (Figura III.5), cuando en *Shaker* es $\sim 13 e_0$.

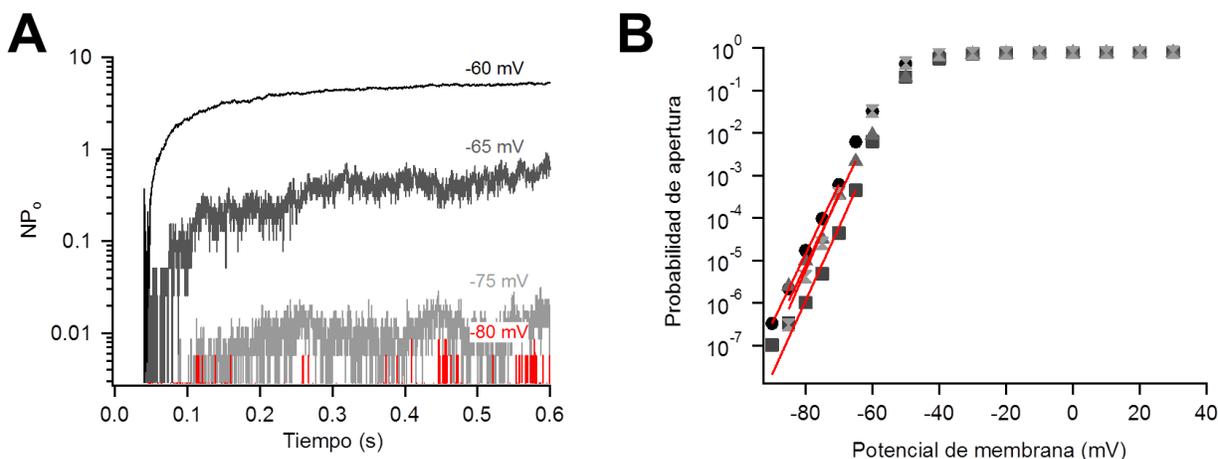


Figura III.5: La activación de Kv1.2 está acoplada a la translocación de $10 e_0$. (A) Reconstrucción del curso temporal de la activación a probabilidades de apertura bajas en un experimento representativo. El producto de la probabilidad de apertura y el número de canales fue obtenido como es descrito en la sección II.2.2, y dividido entre N para obtener P_o . (B) Probabilidad de apertura en función del voltaje. La función exponencial $P(V) = P_0 e^{q_a V/kT}$ fue ajustada en el rango de P_o $10^{-3} - 10^{-7}$ (línea roja) para obtener el valor de q_a , la carga de apertura aparente. $q_a = 10.2 \pm 0.45 e_0$.

El método de la pendiente límite es una medida indirecta de la carga de apertura, por lo que observar una reducción en la sensibilidad al voltaje no necesariamente implica que se transloca menos carga físicamente – también podría significar que hay un desacople parcial entre el movimiento de carga y la apertura del poro [33].

III.6. Medición de la carga de apertura: Corrientes de Cs^+ y de compuerta

Para distinguir entre las dos posibilidades de reducción de la carga de apertura –menor translocación física de carga *vs* transiciones voltaje-dependientes fuera de la vía de acti-

ción-, se midió directamente el desplazamiento de carga a través de la integración de corrientes de compuerta y su división subsecuente entre el número de canales presentes en el gigasello. El número resultante corresponde a la carga que se transloca durante la apertura de un solo canal.

Para medir corrientes iónicas y de compuerta en el mismo experimento, necesarias para medir el número de canales y la carga, respectivamente, usamos el método de Noceti et al [69] esquematizado en la Figura III.6. Los registros se hacen en soluciones de Cs^+ , que atraviesa el poro del canal alrededor de 20 veces más lentamente que K^+ y resulta en corrientes iónicas mucho más pequeñas. Esto permite registrar la corriente de compuerta al potencial de inversión sin problemas de contaminación por corriente iónica, y a la vez es posible estimar el número de canales a partir de la varianza de la corriente iónica medida a otro potencial. El uso de soluciones simétricas, donde el potencial de inversión es 0 mV, es adecuado en este caso porque el máximo movimiento de carga se alcanza a un voltaje más negativo (Figura III.3 B). La relación entre la carga máxima y el número de canales representa la carga de compuerta de cada canal, que en el caso de Kv1.2 es $10.6 \pm 0.6 e_0$. Como control, también se midió la carga de *Shaker* bajo las mismas condiciones experimentales. El resultado de $15.3 e_0$ está de acuerdo con mediciones previas de 12-14 e_0 [31, 28, 29] y es significativamente diferente al de Kv1.2.

El hecho de que la medición directa de la carga de apertura también sea $\sim 10 e_0$, como el resultado por el método de la pendiente límite, demuestra que toda la translocación de carga del DSV está acoplada a la apertura del poro y elimina la posibilidad de que haya movimiento de carga entre estados fuera de la vía de activación.

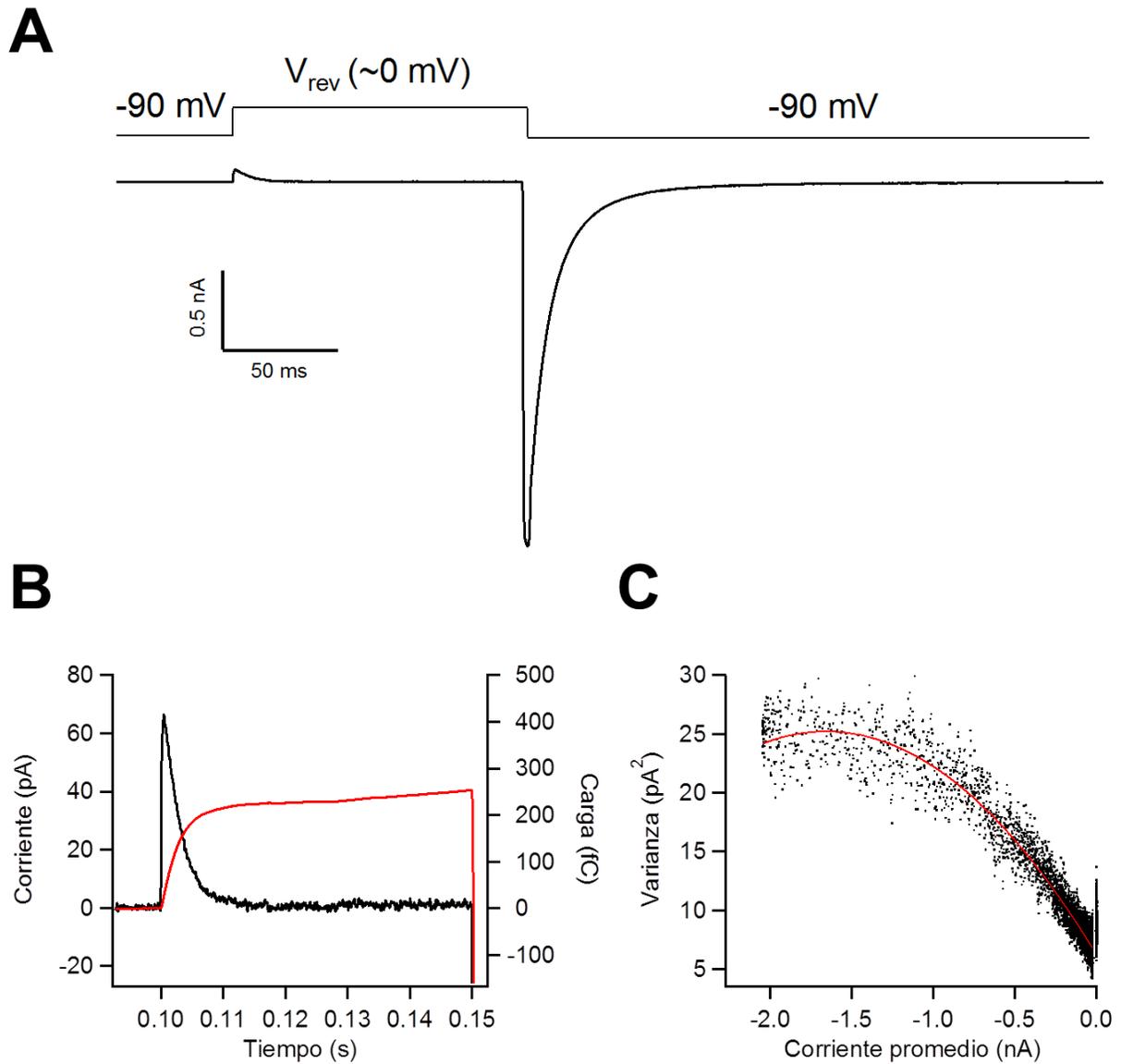


Figura III.6: Medición de la carga por canal. (A) Trazo representativo de un experimento. La membrana se despolarizó al potencial de inversión (alrededor de 0 mV) para obtener la corriente de compuerta libre de contaminación de corriente iónica. Posteriormente, se repolarizó la membrana al potencial de mantenimiento (-90 mV). (B) La corriente de compuerta (trazo negro) fue integrada para obtener la carga de compuerta (trazo rojo). (C) El número de canales fue obtenido a partir de un ajuste de la ecuación $\sigma^2 = iI - I^2/N$ a la varianza de la corriente de cola promedio ($N = 145070$, $i = -0.023$ pA en este parche).

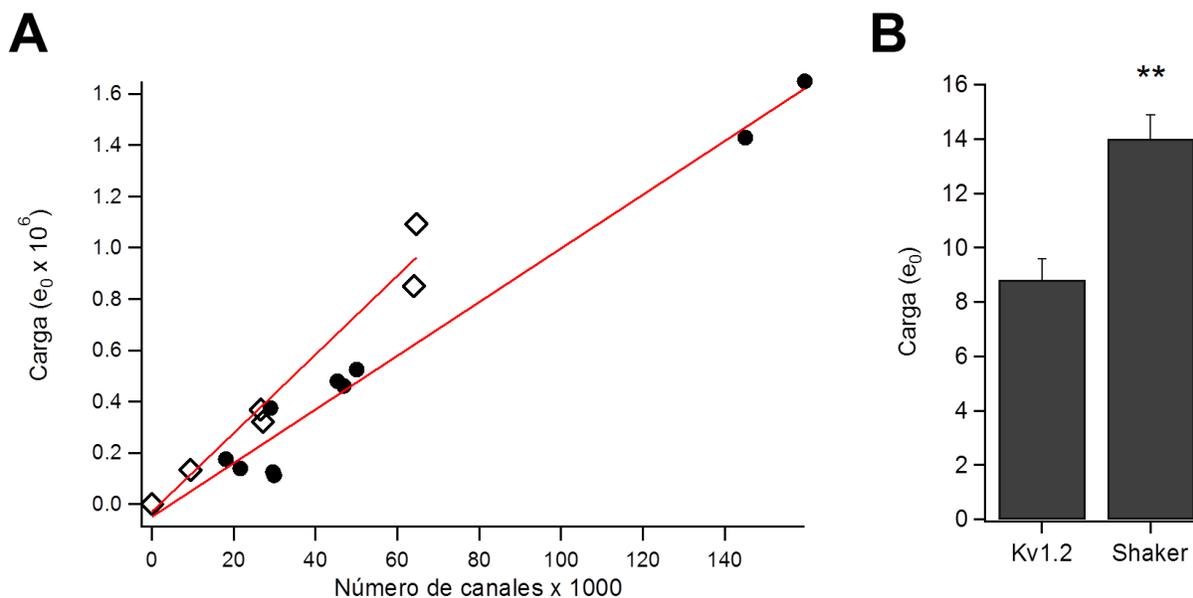


Figura III.7: Se desplazan $10 e_0$ a través de la membrana durante la activación de Kv1.2. La relación entre la carga total y el número de canales en cada experimento (línea roja) ilustra la carga por canal (Kv1.2 = $10.6 e_0$, *Shaker* = $15.3 e_0$). El recuadro muestra el resultado de una prueba de *t*, donde $q_{Kv1.2} = 8.8 \pm 0.8 e_0$, $q_{Shaker} = 14 \pm 0.9 e_0$ y $p = 0.0013$.

III.7. Mutaciones en el dominio sensor de voltaje de Kv1.2

Una vez determinada la carga por canal de Kv1.2, el siguiente paso fue intentar encontrar la razón por la cual es menor que en *Shaker*. Una comparación de la secuencia de las dos proteínas reveló que la región que conecta los segmentos transmembranales 3 y 4 (denominado *linker* S3-S4) de Kv1.2 es considerablemente más corta que la de *Shaker* (Figura III.8 A). Algunos estudios han propuesto que la longitud del *linker* S3-S4 está involucrada en la detección del voltaje, ya que acortar este segmento o romper la helicidad disminuye la carga de apertura [70, 71]. Para probar la hipótesis de que el hecho de que el *linker* S3-S4 de Kv1.2 sea más corto es el causante de la disminución de la carga de apertura comparada con *Shaker*, se construyó una quimera Kv1.2-*Shaker*, donde el *linker* S3-S4 de Kv1.2 es sustituido por el *linker* S3-S4 de *Shaker* (Figura III.8 B). Lamentablemente, fue imposible registrar corrientes iónicas de esta mutante, por lo cual concluimos que no es funcional y nuestra hipótesis no pudo ser examinada.

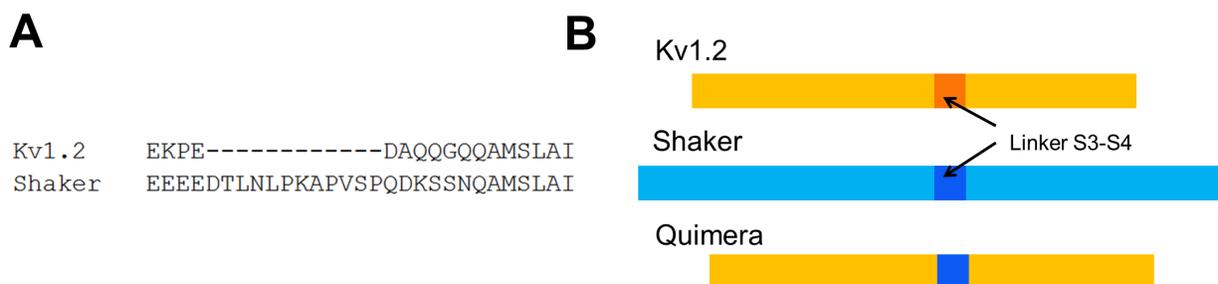


Figura III.8: Construcción de quimera Kv1.2-*Shaker*. (A) Alineamiento de los residuos correspondientes al *linker* S3-S4 en cada canal. (B) Esquema que muestra la región que se intercambi6 entre Kv1.2 y *Shaker* para generar la quimera del *linker* S3-S4.

Otra posible explicaci6n de la reducci6n de la carga es que el S4 no sufra un movimiento tan grande como en *Shaker*, o que la importancia de cada residuo cargado sea diferente porque la constricci6n del campo el6ctrico de los DSV difiera en forma o posici6n entre los dos canales. Una manera relativamente sencilla de examinar cualitativamente el movimiento de las cargas del S4 es neutralizar cada residuo y medir la disminuci6n de la carga de apertura del canal mutante con respecto al silvestre, y posteriormente usar estos datos para construir un mapa de la contribuci6n de cada residuo del S4 a la carga de apertura. M6ltiples mutantes, no todas funcionales, fueron construidas con este fin (Secci6n II.1, Figura III.9).

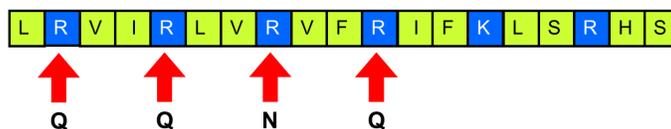


Figura III.9: Neutralizaciones funcionales de residuos b6sicos de S4. Se muestra la secuencia de S4. Cada carga (azul) fue sustituida por los residuos indicados. 6nicamente se se6alan las mutantes que fue posible analizar mediante electrofisiolog6a y que fueron usadas para los experimentos de la secci6n III.8.

III.8. Contribuci6n de los residuos cargados del S4 a la detecci6n del voltaje

Las mutantes funcionales (Figura III.9) difieren del canal silvestre en la cin6tica de activaci6n y cierre, y dos de las curvas de conductancia-voltaje se encuentran desplazadas en direcci6n despolarizante (R1Q) e hiperpolarizante (R2Q) (Figura III.10). Cada mutante fue

construida con la intención de medir su carga de apertura usando el método de la pendiente límite. Sin embargo, la obtención de datos adecuados es técnicamente difícil y consume una cantidad excesiva de tiempo, por lo que se usaron rampas de voltaje para medir la probabilidad de apertura de R1Q, R2Q y R4Q, cuyos altos niveles de expresión permiten la aplicación de este método (Figura III.11 A). Aunque esta es una técnica mucho menos sensible (la probabilidad de apertura más pequeña que pudimos medir con rampas de voltaje fue $\sim 10^{-5}$, comparada con $\sim 10^{-8}$ usando pendiente límite), es posible asignar una importancia relativa a cada residuo comparándolo con el canal silvestre. La única mutante que se estudió usando pendiente límite fue R3N, porque sus niveles de expresión son insuficientes para medir probabilidades de apertura bajas usando rampas (Figura III.11 B). Se encontró que neutralizar R1, R2, R3 y R4 reduce la capacidad del canal para detectar cambios en el voltaje, disminuyendo la carga de apertura en un 55, 17, 20 y 16 % respectivamente (Figura III.11 C).

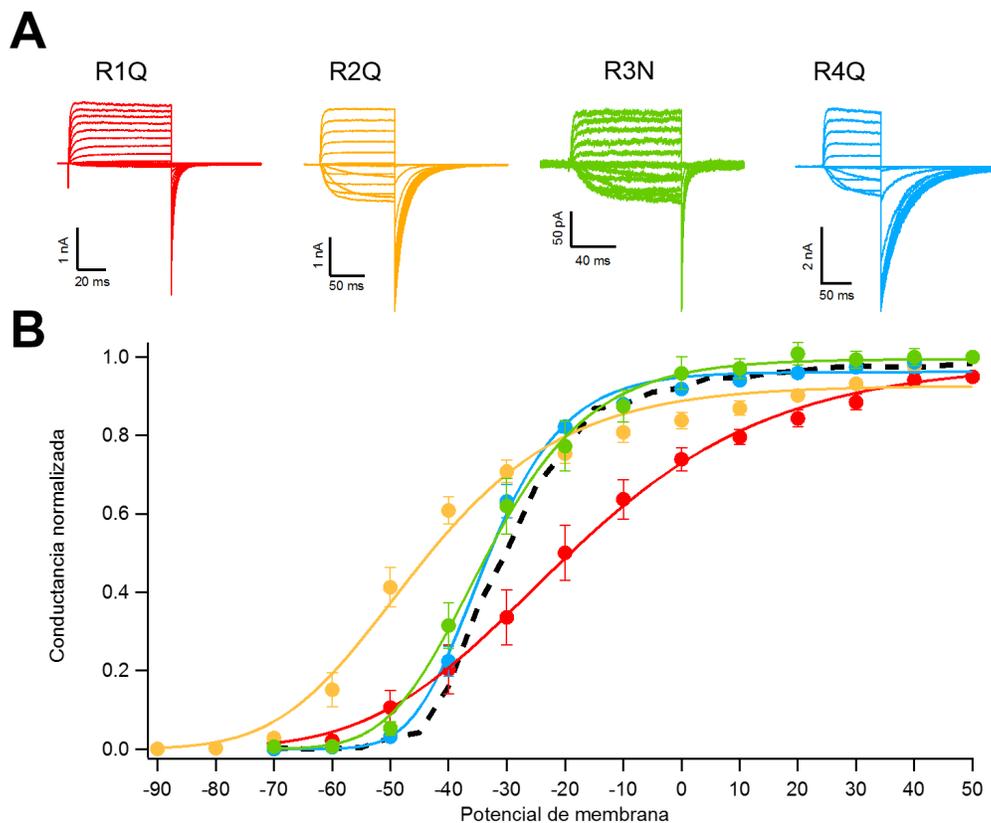


Figura III.10: La neutralización de residuos en S4 modifica las propiedades de Kv1.2. (A) Trazos de corriente representativos de cada mutante. El pulso activador va desde -70 mV hasta 30 mV en incrementos de 10 mV, seguido de un pulso hiperpolarizante a -90 mV. (B) Curvas de conductancia-voltaje de las mutantes funcionales y el canal silvestre. El código de colores es igual que en (A).

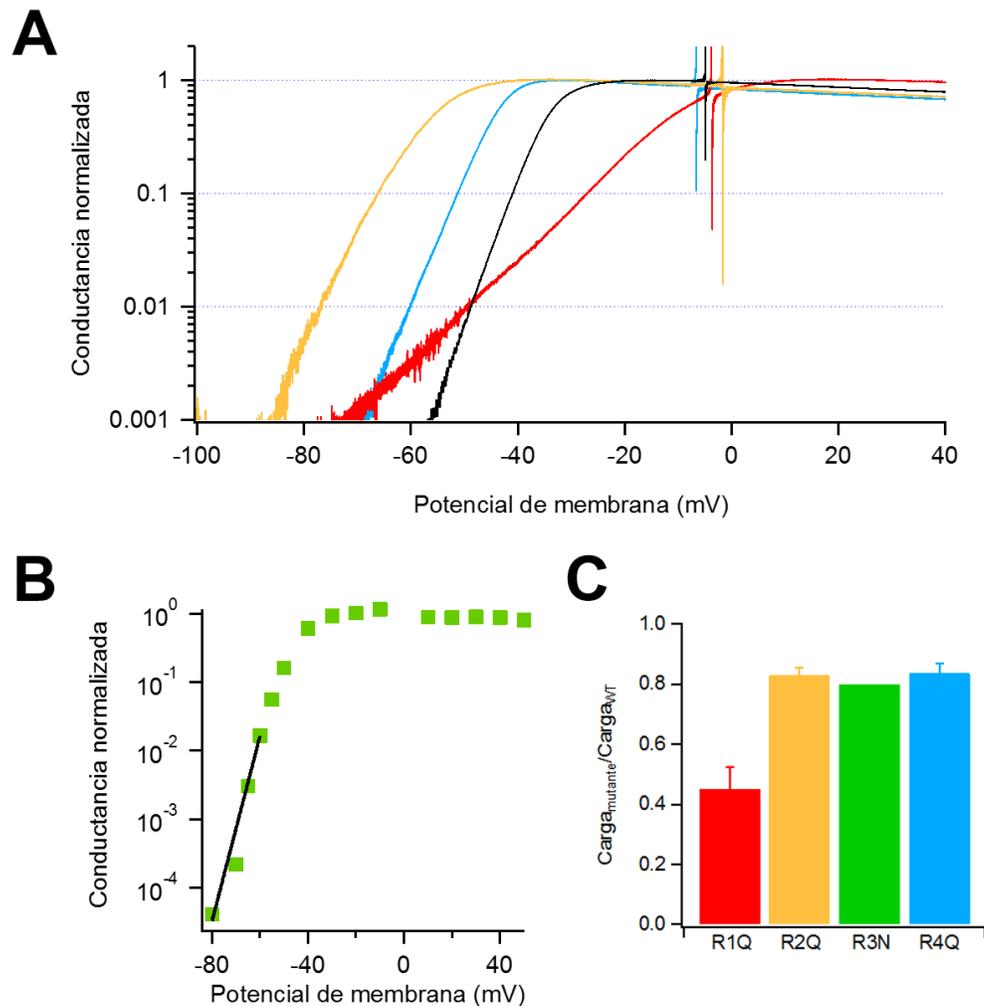


Figura III.11: La sensibilidad al voltaje es alterada en las mutantes neutralizadas. (A) Rampas representativas de R1Q (rojo), R2Q (amarillo), R4Q (azul) y el canal silvestre (negro). La corriente obtenida al aplicar la rampa de voltaje fue convertida a conductancia y normalizada al valor de la conductancia en el estado estacionario. La carga fue calculada mediante el ajuste de la ecuación $Ae^{qV/kT}$ en probabilidades debajo de 10^{-3} . (B) Medición de la carga de apertura de R3N por pendiente límite. Se ajustó la ecuación descrita en (A) en el mismo rango de conductancia, q_a R3N = $8 e_0$ (un solo experimento). (C) Carga de apertura de cada mutante expresada como una fracción de la carga medida por rampas (R1Q, R2Q, R4Q) o por pendiente límite (R3N) en el canal silvestre. $q_{R1} = 0.45$, $q_{R2} = 0.83$, $q_{R3} = 0.78$, $q_{R4} = 0.84$.

A diferencia de *Shaker*, donde la neutralización de cualquiera de las primeras cuatro argininas tiene un efecto equivalente sobre la carga de apertura [29], R1 parece ser un residuo más importante que R2 y R4 en Kv1.2.

Capítulo IV

Discusión

IV.1. Propiedades macroscópicas de Kv1.2

Una inspección superficial del comportamiento de Kv1.2 revela que es un canal Kv clásico: se activa por despolarización, su actividad depende fuertemente en el voltaje, tiene una selectividad $K^+ > Cs^+ \gg Na^+$ y sufre inactivación lenta. Cualitativamente, Kv1.2 es extremadamente similar a *Shaker* en todos estos aspectos. La probabilidad de apertura y la pendiente de la curva de conductancia-voltaje de Kv1.2 es exactamente de la misma magnitud que en *Shaker*, y la carga asociada a las constantes de velocidad de activación y retraso de la activación es bastante similar.

La única diferencia, pequeña pero notable, que se encontró fue que Kv1.2 se activa más lentamente que *Shaker*. El valor de las constantes de tiempo de activación de Kv1.2 es mayor que en *Shaker* [31] en todo el rango de voltaje al cual se pulsó la membrana, y para que el modelo cinético de *Shaker* ajustara las corrientes macroscópicas de Kv1.2 se tuvieron que reducir todas las constantes de velocidad que llevan al estado abierto que se publicaron en el artículo original [59]. La reducción de la velocidad es sugerente de que las barreras energéticas de las transiciones activadoras son más altas en Kv1.2 que en *Shaker*.

Otra observación notable es que varias mutaciones que están muy bien caracterizadas en *Shaker* son irreproducibles en Kv1.2. La inactivación tipo C en la mutante W366F, análoga a *Shaker* W434F, también se acelera considerablemente, pero no al grado de abolir la conducción [62]. Es posible que exista una diferencia estructural ligera entre el poro de los dos canales que cause que el filtro de selectividad de Kv1.2 cambie de conformación a una velocidad distinta. Otra mutación notable es la sustitución del linker S3-S4 de Kv1.2 con el de *Shaker*. Se han llevado a cabo varios estudios con mutagénesis extensiva en esa región de

Shaker, así que fue sorprendente que Kv1.2 fuera susceptible a la adición de un segmento de 11 residuos en una región que clásicamente tolera sustituciones [70, 71, 72]. Una posibilidad es que se modificaran señales de inserción de los segmentos transmembranales y que la quimera fuera incapaz de plegarse correctamente. El segmento S4 de Kv1.2 también es marcadamente vulnerable a mutaciones comparado con *Shaker* [29]. Aunque es difícil inferir la razón por la cual una proteína mutante no es funcional, el hecho de que las mutaciones en Kv1.2 no tengan el mismo efecto de *Shaker* sugiere inequivalencias estructurales entre los dos canales.

IV.2. Carga de apertura de Kv1.2

La carga de apertura es una medida compleja que refleja no sólo el movimiento de S4, sino el comportamiento de todas las cargas presentes en la proteína y la distribución e intensidad del campo eléctrico que las rodea. La magnitud de la carga de compuerta depende de la distancia eléctrica que recorra cada carga positiva del VSD, que a su vez es una función de la distancia en Å que cada carga se desplaza y la intensidad del campo eléctrico en el camino que recorre, por lo tanto es sumamente complicado atribuir una contribución específica a cada factor, o determinar alguno de ellos cuantitativamente. Sin embargo, a la luz de estudios que aproximan la posición de algunas cargas en el estado cerrado y mediciones del grosor de la constricción del campo eléctrico del DSV, es posible interpretar la carga de apertura para estimar la magnitud del movimiento de S4 y la forma del septo del DSV.

El trabajo realizado hasta el momento indica que Kv1.2 tiene una sensibilidad menor a los cambios en el potencial transmembranal de lo que se esperaría por su similitud a *Shaker*, y la reducción de la dependencia en el voltaje no se debe a que el acoplamiento electromecánico sea laxo. Un estudio de dinámica molecular del movimiento de activación del DSV sugiere una posible razón para la reducción de la carga: las simulaciones usando la estructura de Kv1.2 silvestre resultan en una translocación de $10 e_0$, en concordancia con nuestros datos. Para que la carga de apertura aumente a $\sim 13 e_0$, como en *Shaker*, es necesario reorientar *in silico* la cadena lateral de R1 de tal manera que quede más cerca de la membrana, y consecuentemente, de su campo eléctrico [23]. Tomando en cuenta estos datos, nuestra hipótesis inicial era que en Kv1.2 la primera arginina contribuía muy poco a la transferencia de carga porque estaba en una posición demasiado extracelular para atravesar totalmente el campo eléctrico de la membrana, fenómeno que sucede en *Shaker* [41]. Si esto fuera cierto, la neutralización de R1 debería tener un impacto mínimo o nulo en la dependencia de la apertura del canal en el voltaje. Sin embargo, lo que se encontró fue que R1 es la carga con el rol más importante en el S4 de Kv1.2, puesto que neutralizarla reduce

la carga de apertura por 55 % (Figura III.11). En vista de los resultados experimentales, se descartó esta explicación de la reducción de la carga de apertura.

Una reducción del 55 % en la sensibilidad al voltaje se traduce en 5.8 cargas elementales (el 55 % de $10.6 e_0$). En teoría, la máxima contribución de cada residuo es $4e_0$ (una carga elemental por subunidad que atraviesa la totalidad del campo eléctrico de la membrana). El hecho de que neutralizar R1 disminuya la carga de apertura por más de $4e_0$ indica que el papel de R1 no es únicamente translocar carga, sino que el quitarla de su posición altera la conformación de la proteína en el estado abierto y/o cerrado, de tal manera que el S4 mutante no se desplaza tanto como el silvestre. A la luz de estudios en *Shaker* donde R1 se encuentra cerca de una fenilalanina extremadamente conservada entre DSVs en el estado cerrado [73, 74], una posible explicación de la importancia de R1 es que actúe como un candado que atrapa a la hélice en una posición intracelular. En su ausencia, el S4 mutante no sería capaz de desplazarse hasta su posición original en el canal silvestre, resultando en menos movimiento de todas las cargas del S4.

Los experimentos de neutralización de las argininas del S4 de Kv1.2 indican que R1 contribuye significativamente más a la detección del voltaje que las argininas posteriores, a diferencia de *Shaker*, donde los primeros cuatro residuos cargados tienen una contribución equivalente [29]. Esta es una diferencia notable que sugiere una explicación para que la carga de apertura de Kv1.2 sea menor comparada con la de *Shaker*: algunas cargas que atraviesan la totalidad del campo eléctrico durante la activación de *Shaker* no lo hacen en Kv1.2. Una hipótesis consistente con la contribución diferencial de cada carga es que el septo hidrofóbico donde se concentra el campo eléctrico del DSV de Kv1.2 sea más grueso que el de *Shaker*. De acuerdo con los datos aquí presentados, dos grupos realizaron simulaciones de la penetración del agua a las cavidades del DSV de Kv1.2, y encontraron una región de 13-15 Å donde la densidad de moléculas de agua es nula [75, 76], considerablemente más que los 3-5 Å propuestos para *Shaker*[37, 40, 41].

Es importante mencionar que es posible que la contribución diferente de R1 en comparación con la de las siguientes tres argininas sea un artefacto de la mutación. Como fue propuesto arriba, R1 podría ser necesaria para que el S4 llegue a su posición más profunda cuando la membrana está hiperpolarizada, y en su ausencia el nuevo estado desactivado de S4 estaría un poco más cerca de la cara extracelular de la membrana porque R2 sería el nuevo “candado”. Dado que esto tendría como resultado un menor desplazamiento de todo el S4, la mutante movería considerablemente menos carga, pero no necesariamente significaría que R1 es más importante que el resto de las Arg en Kv1.2 silvestre. Aunque este escenario

fuera el correcto, la reducción de carga aún podría interpretarse como un engrosamiento del septo: la magnitud de la contribución de R2, R3 y R4 es menor que en *Shaker* [29], y un desplazamiento idéntico de la hélice en un campo eléctrico menos concentrado resultaría en menos carga de apertura. Alternativamente, es posible que el S4 de Kv1.2 recorra una distancia menor que el S4 de *Shaker*. Se requieren más experimentos para distinguir entre todas las posibilidades mencionadas en esta sección.

IV.3. Impacto en el campo de la detección de voltaje

Este trabajo muestra que Kv1.2 es significativamente menos sensible al voltaje de lo que se esperaba por su similitud a *Shaker*, y que al usar los parámetros de *Shaker* como restricciones, las simulaciones de dinámica molecular están sobreestimando el movimiento del S4 o la delgadez del septo del DSV. Las mediciones realizadas en este estudio resultarán útiles para la construcción de un modelo del DSV en el estado desactivado y la simulación adecuada de los cambios conformacionales del DSV.

Conclusiones

- Las propiedades macroscópicas de Kv1.2 son sumamente similares a las de *Shaker*.
- Los efectos de mutaciones en *Shaker* no son completamente reproducibles en Kv1.2, lo que sugiere discrepancias estructurales entre los dos canales.
- Kv1.2 se activa con una sensibilidad al voltaje correspondiente al acoplamiento entre el movimiento de $10 e_0$ y la apertura del poro.
- $10 e_0$ se translocan físicamente durante la activación del DSV de Kv1.2.
- No hay movimiento de carga fuera de la vía de activación de Kv1.2.
- La reducción de la carga de apertura de Kv1.2 con respecto a la de *Shaker* se origina en una menor contribución de la segunda, tercera y cuarta arginina del S4.
- Los datos son consistentes con un modelo donde las cavidades accesibles al solvente del DSV de Kv1.2 no son tan profundas como en *Shaker*.

Bibliografía

- [1] A. G. Volkov, L. O’Neal, M. I. Volkova, and V. S. Markin, “Morphing structures and signal transduction in *Mimosa pudica* L. induced by localized thermal stress,” *Journal of Plant Physiology*, vol. 170, no. 15, pp. 1317–1327, 2013.
- [2] F. Leliaert, D. R. Smith, H. Moreau, M. D. Herron, H. Verbruggen, C. F. Delwiche, and O. De Clerck, “Phylogeny and molecular evolution of the green algae,” *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 31, no. 1, pp. 1–46, 2012.
- [3] L. M. Mähnger and R. T. Hanlon, “Malleable skin coloration in cephalopods: selective reflectance, transmission and absorbance of light by chromatophores and iridophores,” *Cell and Tissue Research*, vol. 329, no. 1, pp. 179–186, 2007.
- [4] W. F. Boron and E. L. Boulpaep, *Medical Physiology, 2nd Edition: Updated*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [5] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*. Garland Science, 2008.
- [6] C. A. Robbins and B. L. Tempel, “Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models,” *Epilepsia*, vol. 53, no. s1, pp. 134–141, 2012.
- [7] H. M. Brew, J. X. Gittelman, R. S. Silverstein, T. D. Hanks, V. P. Demas, L. C. Robinson, C. A. Robbins, J. McKee-Johnson, S. Y. Chiu, A. Messing, *et al.*, “Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit Kv1.2, but hypoexcitability and enlarged Kv1 currents in auditory neurons,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 98, no. 3, pp. 1501–1525, 2007.
- [8] J. M. Gulbis, M. Zhou, S. Mann, and R. MacKinnon, “Structure of the cytoplasmic β subunit–T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels,” *Science*, vol. 289, no. 5476, pp. 123–127, 2000.

-
- [9] M. Li, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, “Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel,” *Science*, vol. 257, no. 5074, pp. 1225–1230, 1992.
- [10] N. Vivienne Shen, X. Chen, M. M. Boyer, and P. J. Pfaffinger, “Deletion analysis of K⁺ channel assembly,” *Neuron*, vol. 11, no. 1, pp. 67–76, 1993.
- [11] K. B. Craven and W. N. Zagotta, “CNG and HCN channels: two peas, one pod,” *Annual Review of Physiology*, vol. 68, pp. 375–401, 2006.
- [12] T. Hoshi, A. Pantazis, and R. Olcese, “Transduction of voltage and Ca²⁺ signals by Slo1 BK channels,” *Physiology (Bethesda)*, vol. 28, no. 3, pp. 172–189, 2013.
- [13] B. Hille, *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Sunderland, MA, 2001.
- [14] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity,” *Science*, vol. 280, no. 5360, pp. 69–77, 1998.
- [15] G. Yellen, “The voltage-gated potassium channels and their relatives,” *Nature*, vol. 419, no. 6902, pp. 35–42, 2002.
- [16] Y. Liu, M. Holmgren, M. E. Jurman, and G. Yellen, “Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel,” *Neuron*, vol. 19, no. 1, pp. 175–184, 1997.
- [17] M. Holmgren, K. S. Shin, and G. Yellen, “The activation gate of a voltage-gated K⁺ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge,” *Neuron*, vol. 21, no. 3, pp. 617–621, 1998.
- [18] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel,” *Nature*, vol. 417, no. 6888, pp. 515–522, 2002.
- [19] T. Hoshi, W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich, “Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation,” *Science*, vol. 250, no. 4980, pp. 533–538, 1990.
- [20] T. Hoshi, W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich, “Two types of inactivation in shaker K⁺ channels: Effects of alterations in the carboxy-terminal region,” *Neuron*, vol. 7, no. 4, pp. 547–556, 1991.

-
- [21] T. Hoshi and C. M. Armstrong, “C-type inactivation of voltage-gated K^+ channels: [ore constriction or dilation?,” *The Journal of General Physiology*, vol. 141, no. 2, pp. 151–160, 2013.
- [22] K. J. Swartz, “Sensing voltage across lipid membranes,” *Nature*, vol. 456, no. 7224, pp. 891–897, 2008.
- [23] F. Khalili-Araghi, V. Jogini, V. Yarov-Yarovoy, E. Tajkhorshid, B. Roux, and K. Schulten, “Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel,” *Biophysical Journal*, vol. 98, no. 10, pp. 2189–2198, 2010.
- [24] C. M. Armstrong and F. Bezanilla, “Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels,” 1973.
- [25] R. Keynes and E. Rojas, “Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon,” *The Journal of Physiology*, vol. 239, no. 2, pp. 393–434, 1974.
- [26] S. R. Durell and H. R. Guy, “Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels,” *Biophysical Journal*, vol. 62, no. 1, pp. 238–250, 1992.
- [27] F. J. Sigworth, “Voltage gating of ion channels,” *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 27, no. 01, pp. 1–40, 1994.
- [28] N. E. Schoppa, K. McCormack, M. A. Tanouye, and F. J. Sigworth, “The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels,” *Science*, vol. 255, no. 5052, pp. 1712–1715, 1992.
- [29] S. K. Aggarwal and R. MacKinnon, “Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K^+ channel,” *Neuron*, vol. 16, no. 6, pp. 1169–1177, 1996.
- [30] W. Almers, “Gating currents and charge movements in excitable membranes,” in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 82*, pp. 96–190, Springer, 1978.
- [31] L. D. Islas and F. J. Sigworth, “Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels,” *The Journal of General Physiology*, vol. 114, no. 5, pp. 723–742, 1999.
- [32] F. Bezanilla, “The voltage sensor in voltage-dependent ion channels,” *Physiological Reviews*, vol. 80, no. 2, pp. 555–592, 2000.

-
- [33] D. Sigg and F. Bezanilla, “Total charge movement per channel: the relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation,” *The Journal of General Physiology*, vol. 109, no. 1, pp. 27–39, 1997.
- [34] F. Bezanilla, “How membrane proteins sense voltage,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 4, pp. 323–332, 2008.
- [35] N. Yang, A. L. George Jr, and R. Horn, “Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels,” *Neuron*, vol. 16, no. 1, pp. 113–122, 1996.
- [36] H. P. Larsson, O. S. Baker, D. S. Dhillon, and E. Y. Isacoff, “Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4,” *Neuron*, vol. 16, no. 2, pp. 387–397, 1996.
- [37] L. D. Islas and F. J. Sigworth, “Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels,” *The Journal of General Physiology*, vol. 117, no. 1, p. 69, 2001.
- [38] D. M. Starace, E. Stefani, and F. Bezanilla, “Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker k⁺ channel,” *Neuron*, vol. 19, no. 6, pp. 1319–1327, 1997.
- [39] D. M. Starace and F. Bezanilla, “Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the Shaker K⁺ channel,” *The Journal of General Physiology*, vol. 117, no. 5, pp. 469–490, 2001.
- [40] D. M. Starace and F. Bezanilla, “A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field,” *Nature*, vol. 427, no. 6974, pp. 548–553, 2004.
- [41] C. A. Ahern and R. Horn, “Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels,” *Neuron*, vol. 48, no. 1, pp. 25–29, 2005.
- [42] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel,” *Nature*, vol. 423, no. 6935, pp. 33–41, 2003.
- [43] B. E. Cohen, M. Grabe, and L. Y. Jan, “Answers and questions from the KvAP structures,” *Neuron*, vol. 39, no. 3, pp. 395–400, 2003.
- [44] Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon, “The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel,” *Nature*, vol. 423, no. 6935, pp. 42–48, 2003.

-
- [45] S. B. Long, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, “Crystal structure of a mammalian voltage-dependent shaker family K^+ channel,” *Science*, vol. 309, no. 5736, pp. 897–903, 2005.
- [46] S. B. Long, X. Tao, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, “Atomic structure of a voltage-dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment,” *Nature*, vol. 450, no. 7168, pp. 376–382, 2007.
- [47] M. Ø. Jensen, V. Jogini, D. W. Borhani, A. E. Leffler, R. O. Dror, and D. E. Shaw, “Mechanism of voltage gating in potassium channels,” *Science*, vol. 336, no. 6078, pp. 229–233, 2012.
- [48] C. S. Schwaiger, S. I. Börjesson, B. Hess, B. Wallner, F. Elinder, and E. Lindahl, “The free energy barrier for arginine gating charge translation is altered by mutations in the voltage sensor domain,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e45880, 2012.
- [49] L. Delemotte, M. Tarek, M. L. Klein, C. Amaral, and W. Treptow, “Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 15, pp. 6109–6114, 2011.
- [50] E. Vargas, V. Yarov-Yarovoy, F. Khalili-Araghi, W. A. Catterall, M. L. Klein, M. Tarek, E. Lindahl, K. Schulten, E. Perozo, F. Bezanilla, *et al.*, “An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations,” *The Journal of General Physiology*, vol. 140, no. 6, pp. 587–594, 2012.
- [51] X. Tao and R. MacKinnon, “Functional analysis of Kv1.2 and paddle chimera Kv channels in planar lipid bilayers,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 382, no. 1, pp. 24–33, 2008.
- [52] A. Scholle, S. Dugarmaa, T. Zimmer, M. Leonhardt, R. Koopmann, B. Engeland, O. Pongs, and K. Benndorf, “Rate-limiting reactions determining different activation kinetics of Kv1.2 and Kv2.1 channels,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 198, no. 2, pp. 103–112, 2004.
- [53] T. Rosenbaum and S. E. Gordon, “Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels,” *Neuron*, vol. 33, no. 5, pp. 703–713, 2002.
- [54] O. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. Sigworth, “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches,” *Pflügers Archiv*, vol. 391, no. 2, pp. 85–100, 1981.

-
- [55] F. Sigworth, “The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier,” *The Journal of Physiology*, vol. 307, no. 1, pp. 97–129, 1980.
- [56] D. Colquhoun and F. Sigworth, “Fitting and statistical analysis of single-channel records,” in *Single-Channel Recording*, pp. 483–587, Springer, 1995.
- [57] L. Heginbotham and R. MacKinnon, “Conduction properties of the cloned shaker k+ channel,” *Biophysical journal*, vol. 65, no. 5, pp. 2089–2096, 1993.
- [58] C.-C. Chao, C.-C. Huang, C.-S. Kuo, and Y.-M. Leung, “Control of ionic selectivity by a pore helix residue in the Kv1.2 channel,” *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 60, no. 6, pp. 441–446, 2010.
- [59] J. L. Ledwell and R. W. Aldrich, “Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation,” *The Journal of General Physiology*, vol. 113, no. 3, pp. 389–414, 1999.
- [60] W. N. Zagotta, T. Hoshi, J. Dittman, and R. W. Aldrich, “Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway,” *The Journal of General Physiology*, vol. 103, no. 2, pp. 279–319, 1994.
- [61] E. Perozo, R. MacKinnon, F. Bezanilla, and E. Stefani, “Gating currents from a non-conducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels,” *Neuron*, vol. 11, no. 2, pp. 353–358, 1993.
- [62] Y. Yang, Y. Yan, and F. J. Sigworth, “How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?,” *The Journal of General Physiology*, vol. 109, no. 6, pp. 779–789, 1997.
- [63] T. Baukrowitz and G. Yellen, “Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms,” *Neuron*, vol. 15, no. 4, pp. 951–960, 1995.
- [64] L. Kiss and S. J. Korn, “Modulation of C-type inactivation by K⁺ at the potassium channel selectivity filter,” *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 4, pp. 1840–1849, 1998.
- [65] D. H. Hackos, T.-H. Chang, and K. J. Swartz, “Scanning the intracellular S6 activation gate in the Shaker K⁺ channel,” *The Journal of General Physiology*, vol. 119, no. 6, pp. 521–531, 2002.
- [66] T. Kitaguchi, M. Sukhareva, and K. J. Swartz, “Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal,” *The Journal of general physiology*, vol. 124, no. 4, pp. 319–332, 2004.

-
- [67] W. N. Zagotta, T. Hoshi, and R. W. Aldrich, “Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation,” *The Journal of General Physiology*, vol. 103, no. 2, pp. 321–362, 1994.
- [68] N. Schoppa and F. Sigworth, “Activation of Shaker potassium channels III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels,” *The Journal of General Physiology*, vol. 111, no. 2, pp. 313–342, 1998.
- [69] F. Noceti, P. Baldelli, X. Wei, N. Qin, L. Toro, L. Birnbaumer, and E. Stefani, “Effective gating charges per channel in voltage-dependent K^+ and Ca^{2+} channels,” *The Journal of General Physiology*, vol. 108, no. 3, pp. 143–155, 1996.
- [70] C. Gonzalez, E. Rosenman, F. Bezanilla, O. Alvarez, and R. Latorre, “Modulation of the Shaker K^+ channel gating kinetics by the S3–S4 linker,” *The Journal of General Physiology*, vol. 115, no. 2, pp. 193–208, 2000.
- [71] C. Gonzalez, E. Rosenman, F. Bezanilla, O. Alvarez, and R. Latorre, “Periodic perturbations in Shaker K^+ channel gating kinetics by deletions in the S3–S4 linker,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 17, pp. 9617–9623, 2001.
- [72] C. Mura, D. Cosmelli, F. Munoz, and R. Delgado, “Orientation of arabidopsis thaliana kat1 channel in the plasma membrane,” *The Journal of membrane biology*, vol. 201, no. 3, pp. 157–165, 2004.
- [73] X. Tao, A. Lee, W. Limapichat, D. A. Dougherty, and R. MacKinnon, “A gating charge transfer center in voltage sensors,” *Science*, vol. 328, no. 5974, pp. 67–73, 2010.
- [74] A. L. Meng-chin, J.-Y. Hsieh, A. F. Mock, and D. M. Papazian, “R1 in the Shaker S4 occupies the gating charge transfer center in the resting state,” *The Journal of General Physiology*, vol. 138, no. 2, pp. 155–163, 2011.
- [75] V. Jogini and B. Roux, “Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K^+ channel in a membrane environment,” *Biophysical Journal*, vol. 93, no. 9, pp. 3070–3082, 2007.
- [76] I. S. Ramsey, Y. Mokrab, I. Carvacho, Z. A. Sands, M. S. Sansom, and D. E. Clapham, “An aqueous H^+ permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 17, no. 7, pp. 869–875, 2010.